

**Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Professor Dr. med. J. Schrader**

**Einflussfaktoren für das myokardiale Proteom  
- Räumliche Heterogenität der Durchblutung  
und die Defizienz von Myoglobin -**

**Untersuchungen an Hunde- und Mäuseherzen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Christian Dominik Fingas**

**2006**

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

gez.: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Nürnberg  
Dekan

Referent: Prof. Dr. U. Decking

Korreferent: Prof. Dr. K. Schrör

*In Erinnerung an meinen Vater*



EXERCITATIO  
ANATOMICA DE  
MOTV CORDIS ET SAN-  
GVINIS IN ANIMALI-  
BVS,

GVILIELMI HARVEI ANGLI,  
*Medici Regii, & Professoris Anatomia in Col-  
legio Medicorum Londinensi.*



*„Le cœur a ses raisons que  
la raison ne connaît point.“*

*Blaise Pascal*

FRANCOFVRTI,  
Sumptibus GVILIELMI FITZERI.

ANNO M. DC. XXVIII



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Aspekte der Proteomanalyse .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition und Entwicklung .....	1
1.1.2	Zielsetzung .....	2
1.1.3	Durchführung und Funktionsprinzipien .....	4
<b>1.2</b>	<b>Heterogenität myokardialer Durchblutung bei Hunden.....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Einführung .....	11
1.2.2	Durchblutungsheterogenität und lokales Proteom .....	14
<b>1.3</b>	<b>Funktionelle Bedeutung von Myoglobin bei Mäusen .....</b>	<b>20</b>
1.3.1	Einführung .....	20
1.3.2	Myoglobin-Defizienz und myokardiales Proteom.....	21
<b>1.4</b>	<b>Ziele der Untersuchungen.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Differential-Display-Proteomanalyse .....</b>	<b>27</b>
2.1.1	Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.....	27
2.1.2	Aufbereitung der Proben .....	29
2.1.3	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	30
2.1.4	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	32
2.1.5	Färbung und densitometrische Auswertung der Gele .....	35
2.1.6	Schritte der Peptidsequenzanalyse mit ESI-MS/MS.....	36
2.1.7	Proteinidentifikation über Datenbanken .....	39
<b>2.2</b>	<b>Ergänzende morphologische Untersuchung.....</b>	<b>41</b>
2.2.1	Gewinnung des Probenmaterials .....	41
2.2.2	Elektronen- und Lichtmikroskopie .....	42
2.2.3	Morphometrische Auswertung .....	43
<b>2.3</b>	<b>Varia .....</b>	<b>45</b>
2.3.1	Statistik .....	45
2.3.2	Chemikalien/Reagenzien .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Optimierung und allgemeine Auswertung beider Proteomanalysen ..</b>	<b>48</b>
3.1.1	Optimierung und Evaluation der 2D-PAGE.....	48
3.1.2	Anzahl und Verteilung erfasster Proteinspots .....	50
3.1.3	Ermittlung signifikanter Proteinspots .....	53
3.1.4	Identifikation signifikanter Proteine.....	57

<b>3.2</b>	<b>Durchblutungsheterogenität und lokales Proteom .....</b>	<b>59</b>
3.2.1	Proteomanalyse .....	59
3.2.2	Ergänzende morphologische Untersuchung .....	65
<b>3.3</b>	<b>Myoglob indefizienz und myokardiales Proteom .....</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Heterogenität der myokardialen Durchblutung .....</b>	<b>74</b>
4.1.1	Weiterführende Experimente .....	74
4.1.2	NO-Stoffwechsel .....	76
4.1.3	$\beta$ -Oxidation und Glykolyse .....	79
4.1.4	Sonstige Änderungen im Proteinexpressionsmuster .....	81
4.1.5	Morphologische Untersuchung .....	82
4.1.6	Folgeuntersuchung .....	83
4.1.7	Schlussbetrachtung .....	83
<b>4.2</b>	<b>Myoglob indefizienz .....</b>	<b>85</b>
4.2.1	Weiterführende Experimente .....	85
4.2.2	Fettstoffwechsel und Glykolyse .....	87
4.2.3	Antioxidativer Stoffwechsel .....	89
4.2.4	Sonstige Änderungen im Proteinexpressionsmuster .....	91
4.2.5	Folgeuntersuchungen .....	92
4.2.6	Schlussbetrachtung .....	93
<b>4.3</b>	<b>2D-PAGE-basierte Proteomanalyse .....</b>	<b>95</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>99</b>
4.4.1	Heterogenität der myokardialen Durchblutung .....	99
4.4.2	Myoglob indefizienz .....	100
4.4.3	Proteomanalytik .....	101
<b>5</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>
<b>5.1</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>5.2</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>122</b>
<b>5.3</b>	<b>Chemikalien/Reagenzien .....</b>	<b>125</b>
<b>5.4</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>127</b>
<b>5.5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>128</b>
<b>5.6</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>129</b>
<b>5.7</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>130</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aspekte der Proteomanalyse

Wenn auch nicht neu, so zählt die Proteomanalyse ähnlich dem cDNA-Chip zu den jüngeren methodischen Entwicklungen, steht aber im Gegensatz zu ihm noch am Anfang ihrer Entwicklung. In dieser Arbeit werden zwei Fragestellungen mittels dieser Methodik untersucht. Zunächst werden die relevanten methodischen Aspekte dieser inzwischen sehr umfangreichen Thematik skizziert. Es folgen kurze Einführungen in die bearbeiteten Themenbereiche selber. Bemerkungen zu den Limitationen der Proteomanalyse sind Kap. 4.3 mögliche Entwicklungen Kap. 4.4.3 zu entnehmen.

### 1.1.1 Definition und Entwicklung

Der Begriff „Proteom“ wurde 1996 offiziell von dem Australier Marc Wilkins (222) in sprachlicher Anlehnung an den Term „Genom“ begründet und ist seit 1999 auch in der Brockhaus-Enzyklopädie zu finden. Ein Proteom ist die quantitative Darstellung des gesamten Proteinexpressionsmusters einer Zelle, eines Gewebes, einer Körperflüssigkeit oder eines Organismus unter genau definierten Rahmenbedingungen (128). Anders als das Genom - einem statischen, durch Abfolge, Art und Anzahl seiner Nukleotide relativ gut definierten Gebilde - stellt das Proteom ein ungleich dynamischeres und durch eine weitaus größere Anzahl von Parametern beeinflusstes Objekt dar, welches zudem methodisch auch schwerer erfassbar ist.

Die Proteinforschung hat eine deutlich ältere Tradition als die Genomforschung und die Anfänge der Proteomanalyse gehen auf die erstmalige Beschreibung einer auch heute noch grundlegenden Technik, der zweidimensionalen Gelelektrophorese 1975 durch Klose (110) und O'Farrel (153) zurück. Zunächst als hochauflösende Trenntechnik für die Isolierung von  $10^3$ - $10^4$  Proteinen gedacht, wurde sie zunehmend auch zur Beantwortung medizinischer Fragestellungen genutzt, indem man die Proteinmuster von Proben aus verschieden definierten Zuständen (krank versus gesund, etc.) miteinander verglich ( $\hat{=}$  subtraktiver Ansatz). Die Sequenzierung und Identifizierung

interessierender Proteine in großem Stile konnte jedoch mit den zeitaufwendigen Methoden der damaligen Proteinforschung (Edman-Abbau, etc.) (45, 46) nicht realisiert werden, zumal die proteinchemischen Techniken auch inkompatibel zur Gelmatrix waren. Viele Wissenschaftler wandten sich der Erfolg versprechenden Genomforschung zu und die Proteomanalyse erfuhr erst mit der Entwicklung von neuartigen massenspektrometrischen Verfahren mit „milden“ Ionisierungsverfahren wie MALDI (100) und ESI (49) sowie durch das Aufkommen der immer leistungsstärkeren Bioinformatik mit der Möglichkeit umfassender Datenbankrecherchen (Kap. 1.1.3) eine Renaissance. Nicht zuletzt wurde auch die Gelelektrophorese bedeutend weiterentwickelt (immobilisierte pH-Gradientenstreifen [IPG's], etc.) (73) und um alternative Verfahren z. B. chromatographischer Natur ergänzt, bei denen man ganz auf die Fixation der Proteine in einer Gelmatrix verzichtet (142).

Mittlerweile haben sich mehrere Disziplinen der Proteomforschung herausgebildet (160): die nach dem Vorbild des „Humanen Genomprojektes“ anvisierte systematische Mikrocharakterisierung des gesamten Proteoms, die gezielte Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen sowie die im Folgenden beschriebene Differential-Display-Proteomanalyse mit subtraktivem Ansatz durch den Vergleich von Proteinmustern definierter Zustände.

### 1.1.2 Zielsetzung

Selbst umfassende mRNA-Analysen mit Hilfe z. B. der cDNA-Chip-Technologie („Transcriptomics“) lassen nicht unmittelbar auf Qualität und Quantität der Proteinexpression schließen (1) – so auch bei Herzgewebe (28, 41). Die Gründe hierfür sind offensichtlich und zahlreich: vergleichsweise viele Proteine stehen ungleich weniger Genen gegenüber (beim Menschen liegt das Verhältnis bei einer theoretischen Größenordnung von  $10^6$ - $10^7$  zu etwa 25.000 bis 30.000) (184, 212) und die Beziehung kodierender DNA-Abschnitte zu exprimierten Proteinen ist überwiegend komplex sowie durch zahlreiche Hilfsmoleküle mitbestimmt; viele Genprodukte werden mehrfach (über 150 bekannte Arten) (128) posttranskriptional bzw. posttranslational modifiziert (allein die Aminosäure L-Cystein hat über N-Acetyl-L-Cystein hin zu 3'-[S-L-Cysteiny]-L-Histidin

80 bekannte natürlich vorkommende Varianten) (184) und besitzen wie auch die mRNA unterschiedliche die Quantität beeinflussende Halbwertzeiten (ubiquitinmoduliert haben beispielsweise Serin-aminoterminal Proteine eine  $t_{1/2}$  von  $> 20$  h, während diese bei Lysin-aminoterminalen Spezies keine 5 min beträgt) (184); metabolische Regelkreisläufe schließlich führen zu weiteren ständig stattfindenden Protein-/Enzymadaptationen/-interaktionen (Phosphorylierung, etc.; ihrer Analyse widmet sich u. a. die „Metabolomics“-Forschung); usw.



**Abb. 1.1 Ein Genom – zwei Phänotypen.** Häufig gebrauchtes Beispiel: *Papilio machaon* (Schwalbenschwanz) in Erscheinung einer Raupe und als Schmetterling.

Daraus folgt, dass eine mRNA- immer auch durch eine Proteomanalyse ergänzt werden sollte. Diese liefert für Tausende von Proteinen Informationen über die aktuell vorhandene Menge sowie die posttranslationalen Modifikationen, wobei diesem Idealbild auch zahlreiche Limitationen gegenüber stehen (Kap. 4.3) Da auch externe Einflüsse (Temperatur, Kulturbedingungen, Hormone/Pheromone, Pharmaka, Stress, etc.) zu subtilen, genetisch zumindest nicht unmittelbar kodierten Veränderungen von Proteinexpressionsmustern führen ( $\hat{=}$  epigenetische Phänomene), müssen die Randbedingungen einer solchen Analyse genau definiert sein und möglichst konstant gehalten werden. Andererseits bietet sich auch die Möglichkeit, Änderungen von Mustern als empfindlichen Sensor für eine Störung besagter Randbedingungen zu nutzen ( $\hat{=}$  Perturbationsanalyse).

Letztlich ist nur ein koordiniertes Zusammenspiel aller „Omics“ (Genomics, Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics) mit einer leistungsstarken

Bioinformatik das adäquate Vorgehen, um weitergehende Einblicke in die netzwerkartigen Zusammenhänge biologischer Abläufe zu ermöglichen.

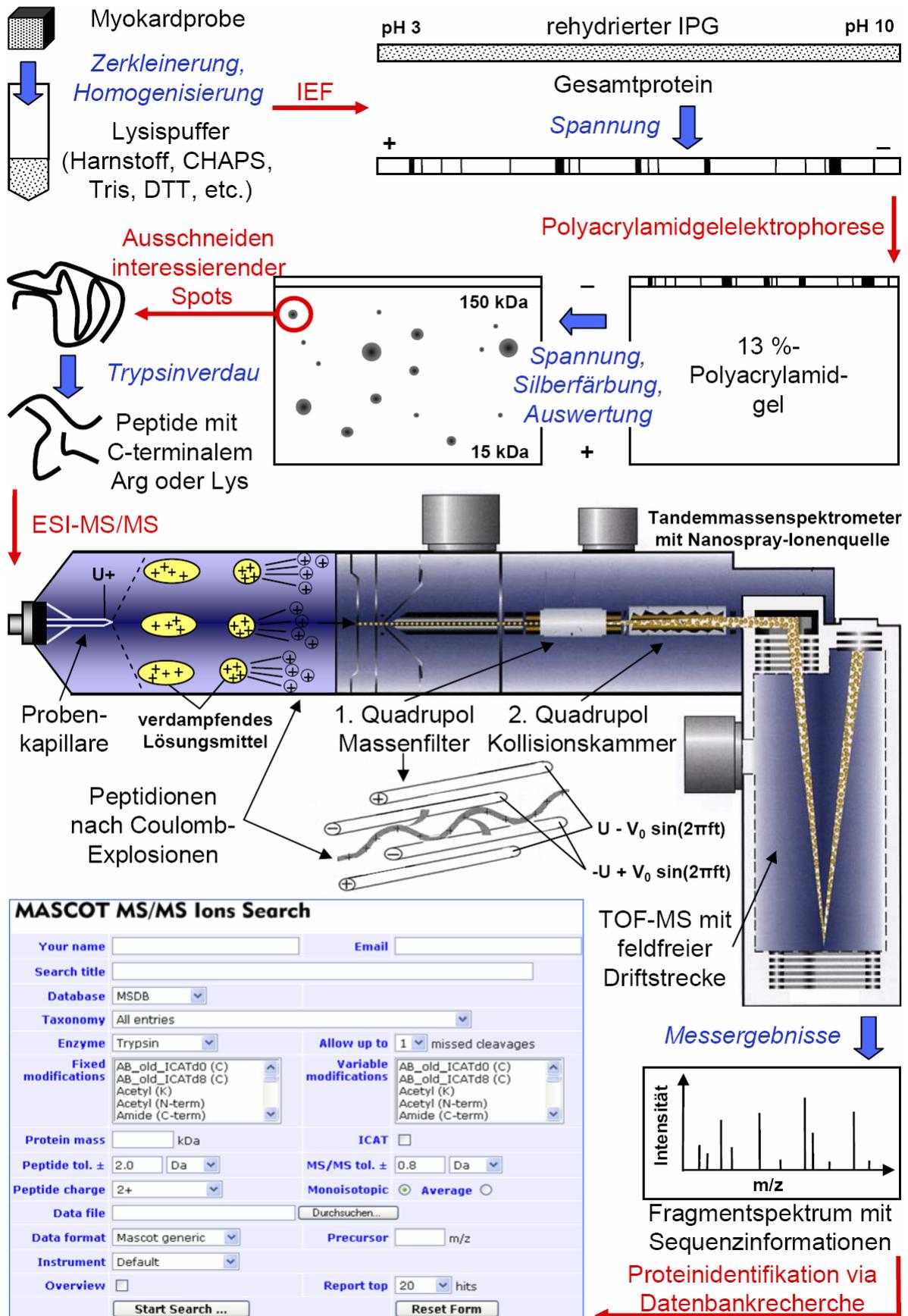
### **1.1.3 Durchführung und Funktionsprinzipien**

Die Proteomanalyse besteht aus mehreren unterschiedlich durchführbaren Schritten. Im Folgenden ist das bei dieser Arbeit gewählte Vorgehen unter Erwähnung der wichtigsten Grundlagen umrissen. Abb. 1.2 liefert einen Überblick, Kap. 2.1 konkrete und ebenfalls teilweise erklärende Arbeitsanleitungen.

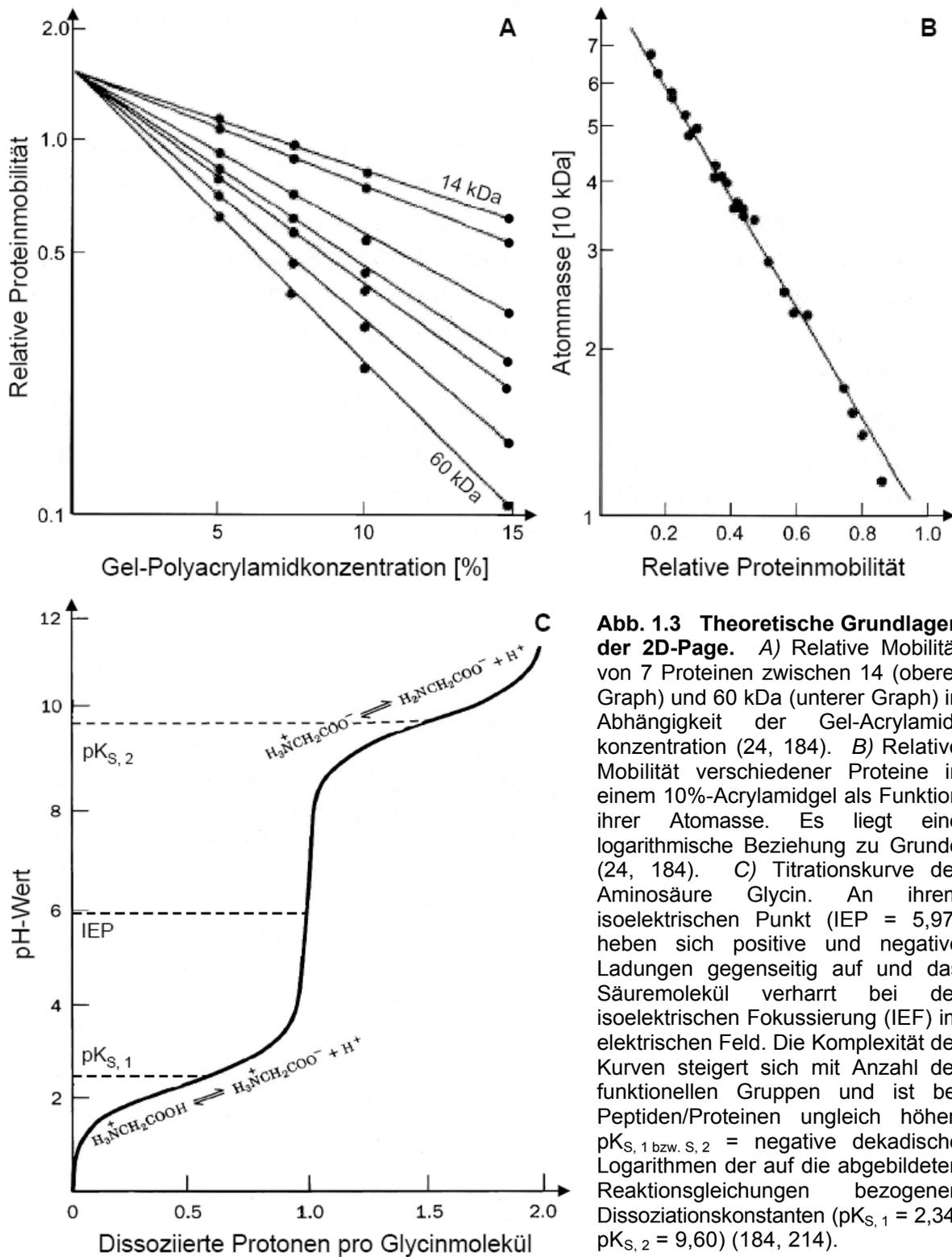
Die zu Anfang stehende Probenpräparation ist zugleich einer der problematischsten Arbeitsschritte, gilt es doch eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine in ihrem Zustand zu konservieren. Zur Vermeidung von Artefaktbildungen wie Degradationen, Oxidationen, etc. sind rasches Vorgehen, ausreichende Kühlung sowie die Verwendung von Puffern mit Proteinaseinhibitoren und Antioxidantien essenziell. Störendes ungelöstes Material nach der Probenhomogenisierung ist per Zentrifuge zu entfernen. Bei myokardialen Gewebe eignet sich die auch hier verwendete Vorschrift in Anlehnung an Weekes et al. (217).

Für die sich anschließende isoelektrische Fokussierung (IEF) sollte der Probenpuffer nur zwitterionische oder nicht-ionische Detergentien enthalten. Die aufzutragende Probenmenge richtet sich bei Verwendung von immobilisierten pH-Gradientenstreifen (73) nach deren Länge und pH-Gradienten sowie der Sensitivität der geplanten Färbemethode. Durch Anlegen von Spannung bewegen sich die Proteine solange entlang des pH-Gradienten (erste Dimension) bis sie via Aufnahme resp. Abgabe von  $H^+$ -Ionen an jeweils individuellen Positionen (isoelektrischer Punkt [IEP]) elektrische Neutralität erreichen. Abb. 1.3 C veranschaulicht dieses Verhalten vereinfachend anhand der Titrationskurve einer Aminosäure (184, 214).

Informationen über die zweite Dimension liefert die Polyacrylamidgelelektrophorese, bei der die mittels Natriumdodecylsulfat entfalteten und mit negativen Ladungen versehenen Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld zur kathodennahen Unterseite des Geles wandern (vgl. Abb. 1.3 B) (24, 184). Bei Herstellung der Gele lässt sich deren Porengröße durch die



**Abb. 1.2 Arbeitsschritte einer Proteomanalyse.** Das Schema entspricht dem Vorgehen im Rahmen dieser Untersuchungen. Weiterführende Erklärungen (insbesondere 2D-PAGE, Proteinfärbung, Tandemmassenspektrometrie und Datenbankrecherche) im Text (vgl. auch Kap. 2.1 und speziell zur Peptidsequenzierung mittels Massenspektren Kap. 3.1.4).



Totalacrylamidkonzentration T sowie den Vernetzungsgrad C mit  $T = \frac{\text{Acrylamid [g]} + \text{Bis [g]}}{100 \text{ g}} \cdot 100 \%$  und  $C = \frac{\text{Bis [g]}}{\text{Acrylamid [g]} + \text{Bis [g]}} \cdot 100 \%$  festlegen

(Bis = N, N'-Methylen-Bisacrylamid) (128). Ein Gel mit 20 % T und 3% C hat einen Porendurchmesser von etwa 3,3 nm, der sich bei abnehmenden T- sowie

hohen und niedrigen C-Werten vergrößert. Größere Poren wiederum führen zu höherer Mobilität der Proteine im Gel. Abb. 1.3 A gibt die Beziehung zwischen T und der relativen Mobilität von 7 Proteinen unterschiedlicher Masse bei konstantem C wieder (24, 184). Auf diese Weise, aber auch durch Auswahl eines geeigneten Elektrodenpuffers (z. B. Glycinpuffer für schwerere und Tricinpuffer für kleinere Proteine) (114, 181) lässt sich das Auftrennungsvermögen der Elektrophorese auf die jeweils zu untersuchenden Proteinmassen abstimmen.

Grundlage für die Auswertung der digitalisierten Gele am Computer (Kap. 2.1.5) sowie die massenspektrometrische Peptidsequenzierung ist das Färben der Proteine. Hier gibt es eine Vielzahl von Methoden, wobei sich Sensitivität, dynamische Breite (Farbnuancierungsbreite entsprechend der Proteinmengenverhältnisse), Validität der Proteinquantifizierung, Kompatibilität zu weiteren Verfahren (Massenspektrometrie, Blottingverfahren, etc.), Aufwand und Preis deutlich unterscheiden. Das Spektrum reicht von u. a. autoradiographischen, immunhistochemischen, rutheniumchelatisierten (Sypro-Ruby<sup>®</sup>) (73), fluoreszierenden (164) oder speziell Glycoproteine detektierenden (65) Methoden hin zur klassischen Coomassie- und Silbernitrat- (88, 138) bzw. Silberdiaminfärbung (154). Bei diesen Untersuchungen wurden alle für eine massenspektrometrische Analyse bestimmten Gele (präparative Gele) mit Coomassie-Brillantblau R 250 (Eigenschaften und Färbemechanismus: Kap. 2.1.6) (44) und alle der Ermittlung signifikanter Proteinspots dienenden Gele (analytische Gele) mittels Silbernitrat (17) gefärbt. Letzteres ist noch (67) nicht kompatibel zur Massenspektrometrie, besitzt eine nur geringe dynamische Breite ( $10^2$ ) und quantifiziert die Proteinmengen teilweise fehlerhaft, weist dafür aber u. a. eine vergleichsweise hohe Sensitivität auf (Kap. 2.1.5) (73). Das Prinzip der Färbung basiert auf der Bildung von Silberkeimen durch Reduktion der zugegebenen Silberkationen ( $\text{Ag}^+$  aus  $\text{AgNO}_3$ ) an Peptidbindungen und funktionellen Gruppen zuvor fixierter Proteine. Nach der Zugabe von Reduktionsmitteln (Formaldehyd, etc.) und Schaffung eines alkalischen Milieus (Natriumkarbonat) sind dies die Ausgangspunkte der weiteren Silberreduktion. Durch rasches Erniedrigen des pH-Wertes (Glycin) wird abschließend die andernfalls später einsetzende Entwicklung unerwünschter Bereiche gestoppt.

Nach dem Ausschneiden interessierender Proteinspots aus den präparativen Gelen und der Probenvorbereitung (Trypsinverdau, Eluatbildung, etc.; Kap. 2.1.6) schließt sich die massenspektrometrische Peptidsequenzierung an. In diesem Falle wurde ein

Tandemmassenspektrometer mit Nanospray-Ionenquelle (Sciex Q-Star Pulsar I, PE Applied Biosystems, Foster City, CA USA) verwendet, dass im Anschluss an die Aufnahme von Übersichtsspektren des Massenbereiches  $m/z = 350-1800$  Fragmentspektren der Probenpeptide per Produkt-Ionenanalyse lieferte. Bei einer solchen Messung werden jeweils  $1,5 \mu\text{l}$  Eluat in die dünne Probenkapillare injiziert, welche auf einem Potenzial von einigen Kilovolt gegen eine kurz dahinter befindliche Elektrode liegt (Abb. 1.2). Im elektrischen Feld zerstäubt die Probenlösung in positiv geladene Tröpfchen, welche sukzessive durch das Verdampfen des Lösungsmittels immer weiter schrumpfen, sodass ihre Ladungsdichte zunimmt. Bei einer Größe von wenigen  $\mu\text{m}$  enthalten die Tröpfchen jeweils etwa  $10^5$  Ladungen und gelangen damit an ihre durch die abstoßende Coulombkraft gleicher Ladungen einerseits sowie die zusammenhaltende Oberflächenspannung des Lösungsmittels andererseits bestimmte Stabilitätsgrenze ( $\hat{=}$  Rayleigh-Limit) (128). Jenseits dieser Grenze zerfallen die Tröpfchen mehrfach in kleinere Einheiten von wenigen nm Größe ( $\hat{=}$  Coulomb-Explosionen). Für die folgende Bildung der eigentlichen Gasphaseionen gibt es mehrere Theorien, wobei das Ionenemissionsmodell („Ion Evaporation Model“; IEM) eine fortwährende und direkte Peptidionenemission aus den hochgeladenen Tröpfchen (etwa 70 Ladungen bei einem Radius von 8 nm) vorschlägt (143). Hierbei werden teilweise auch mehrfach geladene Moleküle erzeugt (49).

Die Peptidionen gelangen nun in den ersten, als Massenfilter dienenden Quadrupol, einer parallelen Anordnung vierer Elektroden im Hochvakuum, an die in Anlehnung an Abb. 1.2 eine Gleichspannung  $U$  sowie eine Wechselspannung  $V_0$  angelegt ist. Bei gegebenem  $U/V_0$ -Verhältnis können nur Ionen, welche die Bedingung  $m/z = 5,7 V \omega^{-2} r^{-2}$  erfüllen ( $m/z = \text{Masse-/Ladungsverhältnis}$ ,  $\omega = \text{Kreisfrequenz}$ ,  $r = \text{Feldradius}$ ) (184) in stabilen Bahnen durch das Innere des Quadrupols oszillieren, während alle anderen geladenen Peptide aufgrund exponentiell zunehmender Schwingungsamplituden an die Elektroden prallen.

Peptidionen, die so den zweiten Quadrupol erreichen, werden dort zur Erzeugung eines Massenspektrums durch die Kollision mit Gasatomen fragmentiert und die Produktionen schließlich in das Hochvakuum des TOF-MS („Time of Flight“-Massenspektrometer) weitergeleitet (192). Vereinfachend dargestellt werden sie hier zunächst in einem weiteren elektrischen Feld dergestalt beschleunigt, dass

alle Ionen dieselbe kinetische Energie erfahren, wobei sie aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichtes verschiedene Geschwindigkeiten annehmen. Dies führt im Bereich der sich anschließenden feldfreien Flugrohrdriftstrecke zu unterschiedlichen für das Erreichen des Detektors benötigten Flugzeiten. Dabei gilt  $m/z = 2Ut^2L^{-2}$  ( $m/z$  = Masse-/Ladungsverhältnis,  $U$  = Spannung,  $t$  = Flugzeit  $L$  = feldfreie Driftstrecke), woraus folgt, dass die Ionenmasse dem Quadrat der Flugzeit proportional ist (184). Bei dem hier verwendeten TOF-Analysator wird die ansonsten lineare Flugbahn der Ionen zusätzlich durch einen am Geräteende befindlichen Reflektor umgeleitet, was die Flugstrecke verlängert und darüber die Genauigkeit der Detektion verbessert (132).

Die Bestimmung mehrerer kurzer Aminosäureabfolgen (sequence tags) aus den so gewonnenen Massenspektren (Kap. 3.1.4) (230) ist Grundlage für die in Kap. 2.1.7 beschriebene *In Silico*-Proteinidentifikation. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Nukleotidsequenz- und den hier relevanten Proteinsequenzdatenbanken. Letztere wiederum lassen sich grob in primäre, die eigentlichen (meist anhand von Nukleotidsequenzdatenbanken übersetzten) Aminosäuresequenzen sowie Zusatzinformationen (PMF's [peptide mass fingerprints], 2D-PAGE-Gele, etc.) enthaltende und sekundäre, aus Analysen (Muster-, Gemeinsamkeitensuche, etc.) der primären Datenbanken hervorgegangene Datenbanken unterteilen. Mit Hilfe von Suchwerkzeugen, die diese großen Mengen an Informationen auf verschiedenste Weise miteinander vernetzen, wird die Recherche innerhalb von und zwischen den Datenbanken möglich. So kann man mittels der auch hier verwendeten „*Mascot*“-Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) eine Vielzahl primärer Datenbanken für die Proteinbestimmung aus Massenspektrometriedaten durchsuchen lassen. *Mascot* basiert auf der ab 1993 von Pappin und Perkins (161, 165) entwickelten MOWSE (Molecular Weight Search) und liefert für jede Suche eine der Wahrscheinlichkeit nach geordnete Ergebnisliste. Kontextuell und über einschränkende Zusatzkriterien wie  $M_r$ , IEP, etc. lassen sich die interessierenden Proteine damit im Idealfalle identifizieren. Liegen Proteine in der Probe modifiziert vor oder sind in den Datenbanken einer speziellen Spezies noch nicht enthalten ( $\hat{=}$  De Novo Sequenzierung), bieten z. B. die Internetseiten den Zugriff auf ein Suchwerkzeug (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), welches über den „*Blast*“-Algorithmus die

Möglichkeit bietet, homologe Sequenzen durch Ähnlichkeitssuche in weiteren Spezies aufzuspüren. Als eine weitere Möglichkeit kann man sich, wie in Kap. 2.1.7 beschrieben, bei der Proteinbestimmung ausschließlich auf die optische Auswertung anhand von 2D-PAGE-Datensätzen stützen, was aber nur bei prominenteren Proteinen eindeutige Resultate liefert (26). Abschließend sei eine kleine Auswahl der bekanntesten Vertreter primärer Proteindatenbanken gegeben (184):

- *SWISS-PROT* (Betreiber: Schweizer Institut für Bioinformatik [SIB] und European Bioinformatics Institute [EBI]; sehr zusatzinformativ; <http://www.expasy.ch/sprot>);
- *ExpASy* („Expert Protein Analysis System“-Datenbank; Betreiber: Schweizer Institut für Bioinformatik [SIB]; enthält u. a. 2D-PAGE-Datensätze; <http://www.expasy.ch>);
- *TrEMBL* („Translated European Molecular Biology Laboratory“-Datenbank; ergänzt die SWISS-PROT-Datenbank; <http://www.expasy.ch/sprot>);
- *NCBI nr* („National Center for Biotechnology Information“-Datenbank; u. a. Grundlage für den „BLAST“-Algorithmus [siehe oben]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>);

## 1.2 Heterogenität myokardialer Durchblutung bei Hunden

Mit dem Bezeichnung „Heterogenität der Durchblutung“ ist das räumliche Perfusionssmuster innerhalb des Myokards gemeint. Das Phänomen der räumlichen Heterogenität im Herzen wurde zunächst auch auf Ebene der Durchblutung deutlich. Später zeigte sich, dass Areale mit entweder hohem oder niedrigem Blutfluss ebenfalls Unterschiede bezüglich ihres Stoffwechsels aufweisen. Ausgangspunkt für die hier durchgeführte Analyse der räumlichen und flussabhängigen Verteilung des myokardialen Proteoms sowie einer ergänzenden morphologischen Untersuchung waren nun die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie und bereits veröffentlichten Dissertationsarbeit (95, 117), bei der u. a. die räumliche Heterogenität (n = 7 Beagle) und vor allem zeitliche Stabilität (n = 6 Beagle) des lokalen Blutflusses in den linken Ventrikeln von Versuchshunden via Applikation radioaktiver resp. verschiedenfarbig fluoreszierender Mikrosphären untersucht wurde. Dabei offenbarte sich eine überraschend deutliche zeitliche Stabilität der Durchblutungsmuster, was folglich die Frage nach einer vergleichbaren Verteilung von Unterschieden in der Gen- sowie Proteinexpression aufwarf. Dieses Kapitel gibt eine kurze Einführung zum Thema Blutflussheterogenität und fasst die für die Folgeuntersuchungen relevanten Ergebnisse der vorausgehenden Studie zusammen.

### 1.2.1 Einführung

Trotz einer lange angenommenen und hinsichtlich der Kapillaren-, Mitochondrien- und Myofibrillendichte auch morphologisch zumindest orientierend nachgewiesenen strukturellen Homogenität (194) des linken Ventrikels finden sich dort räumliche Unterschiede in der lokalen Gewebedurchblutung. Diese Differenzen sind schon allein aufgrund ihrer deutlichen Ausprägung und Verteilung von dem so genannten transmuralen Gradienten (physiologische Flusszunahme von subepikardial nach subendokardial um 20-40 %) (4, 19, 21, 48, 194) abzugrenzen. Gleiches gilt auch für andere, durch unterschiedliche Druck-Volumenarbeit (89, 107) in den verschiedenen anatomischen Bereichen des Herzens begründete Flussunterschiede, wie etwa die im rechten Ventrikel um etwa 35-50% geringere spezifische Durchblutung (ca.  $1 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  im linken Ventrikel) (48, 50, 147). Die räumliche Heterogenität der Durchblutung wurde

aufgrund molekularer Flussmarkerstudien erstmals ab 1957 u. a. von Love et al. (129) und Levy et al. (121) vermutet, woraufhin Yipintsoi et al. 1973 sowohl mit molekularen Flussmarkern als auch radioaktiven Mikrosphären aufzeigten, dass der lokale Blutfluss im Myokard in einem größerem Ausmaße variiert als es durch methodische Ungenauigkeiten alleine erklärbar und mit einer homogenen Verteilung des lokalen Energieumsatzes vereinbar wäre (231). Es folgten zahlreiche Untersuchungen an Ratten, Kaninchen, Schafen, Pavianen und auch Hunden (4, 13, 20, 33, 36, 38, 39, 58, 66, 78, 79, 107, 133, 191, 194) - als Übersichtsartikel: (37, 89, 107) - u. a. mit Indikatorverdünnungstechniken (174), fluoreszierenden Mikrosphären (95, 117) sowie auf Magnetresonanz beruhender Bildgebung (13) als weiteren Methoden.

Bestimmt man im Hundeherzen den lokalen myokardialen Fluss *in situ* bei einer Auflösung von ca. 200  $\mu$ l (Proben mit einem Feuchtgewicht von 200 mg), so findet sich in etwa 1/10 des linken Ventrikelgewebes weniger als 50 % ( $\hat{=}$  Niedrigflussareale [NF]) und in etwa einem anderen 1/10 mehr als 150 % ( $\hat{=}$  Hochflussareale [HF]) der durchschnittlichen Substrat- und Sauerstoffversorgung (vgl. auch Abb. 1.4 A und B) (9, 194). Diese NF- und HF-Areale finden sich in allen myokardialen Schichten und ihre Verteilung ist von nicht-zufälliger, clusterartiger Natur (Abb. 1.4 B), was sich in einer errechneten fraktalen Dimension D von 1,2 bis 1,3 (D = 1,0 entspricht hierbei strenger Ordnung mit uniformem Blutfluss und D = 1,5 reinem Zufall) niederschlägt (9, 12, 208, 209).

Erste Untersuchungen mit sequentieller Mikrosphärenabgabe in Abständen von bis zu 4 min (47, 133, 231), welche klären sollten, ob dieses Phänomen zeitlich stabil oder als Momentaufnahme eines fluktuierenden, weitgehend durch herzyklusabhängig unterschiedliche intramurale und koronare Drücke bestimmten Perfusionsmusters zu verstehen ist, legten zunächst periodische Flussszillationen (in 30-90 Sekunden betragenden Abständen) (191) als Ursache für die räumliche Heterogenität nahe ( $\hat{=}$  „Twinkling“). Dabei sollte die mit einer Dilatation der zugehörigen Arteriole einhergehende Flusserhöhung innerhalb eines Herzareals von entsprechenden Flusserniedrigungen der benachbarten Areale begleitet sein. Die Größe der Flussvariabilität wurde von Falsetti et al. (47) und Marcus et al. (133) bei anästhetisierten Hunden in diesem Zusammenhang mit ca. 30 bzw. 25 % angegeben. Spätere Experimente von King et al. (107) hingegen,

bei denen an wachen instrumentierten Pavianen in sechs Intervallen von 20 Minuten über mehrere Stunden Mikrosphären appliziert wurden, zeigten längerfristig eine hohe Stabilität des Flussmusters mit einem zeitlichen Variationskoeffizienten  $CV_{temp}$  von 14,5 %. Die Flussfluktuation in einzelnen Herzarealen über Minuten nahm demnach auch im Bereich von Stunden nicht wesentlich zu. Des Weiteren stellten sich die absoluten Beträge dieser Fluktuationen als klein dar und waren vor allem ungleich geringer als die Flussdifferenzen zwischen NF- und HF-Arealen (93, 106, 107) selber. Auch eine vorübergehende adrenerge Stimulation mit Orciprenalin oder Glucose/Insulin/Kalium-Infusionen vermochte die lokalen Flüsse beider Arealtypen nur kurzfristig (im Falle des Orciprenalins nicht länger als 1 h) über ihre Ausgangswerte zu erhöhen und danach nicht zu verändern (38, 78). In einem weiteren Experiment zum Vergleich von fluoreszierenden mit radioaktiven Mikrosphären bei chronischen Flussmessungen schließlich deutete sich sogar eine zeitliche Stabilität der Flussverteilung über einen Zeitraum von zwei Monaten an (210).

Als zusätzliches Indiz für eine zumindest gewisse zeitliche Stabilität der räumlichen Blutflussheterogenität ließen sich Unterschiede zwischen NF- und HF-Arealen auch auf Ebene des offenbar adaptierten Stoffwechsels und Energieumsatzes feststellen. So konnte gezeigt werden, dass NF-Areale weniger Desoxyglukose (36, 194) sowie Fettsäuren (22, 79) aufnehmen, Desoxyglukose vermindert phosphorylieren (36, 194), ein kleineres Permeabilitätsflächenprodukt für langkettige Fettsäuren haben (22) und sich durch einen proportional zum Blutfluss geringeren Citratzyklusumsatz sowie Sauerstoffverbrauch (34) auszeichnen. Bei Untersuchung der Enzymaktivitäten fielen in diesen Gebieten ebenfalls Verminderungen seitens der Hexokinase (-23 %; Glykolyse) (194), Laktatdehydrogenase (anaerobe Glykolyse) (58), mitochondrialen Succinatdehydrogenase (Citratzyklus) (21) sowie Kreatininkinase (ATP-Regeneration) (58) auf. Des Weiteren konnte nicht nur eine Korrelation zwischen dem lokalen myokardialen Fluss und der Aktivität der Adenylatzyklase (Signaltransduktion), sondern auch zwischen dem mit Isoproterenol stimulierten Blutfluss und cAMP festgestellt werden (172, 173). Keine Unterschiede hingegen fanden sich bezüglich der mitochondrialen Enzyme Citrat-Synthase (Citratzyklus) und Cytochrom c-Oxidase (mitochondriale Atmungskette) sowie der zytosolischen

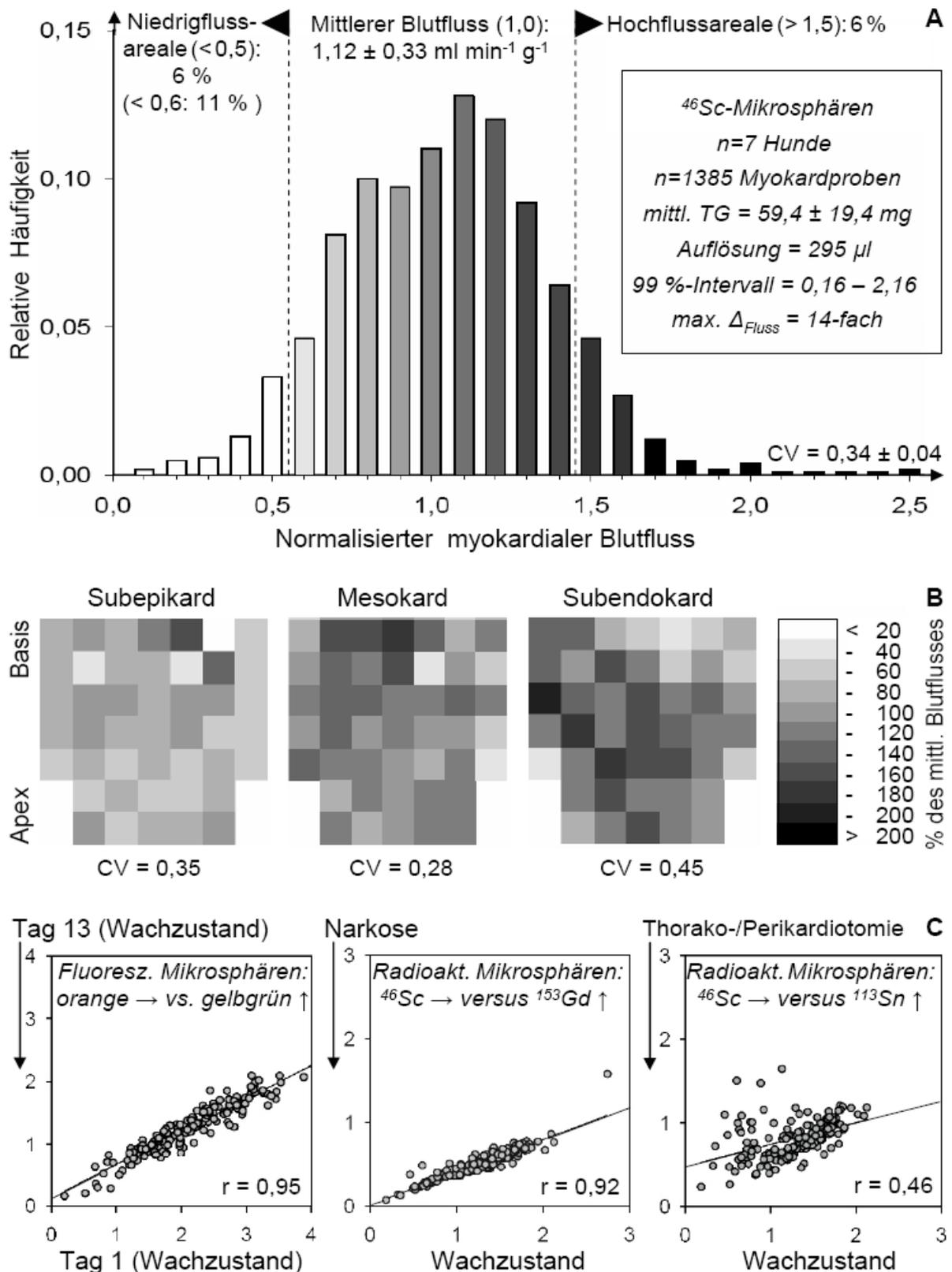
Phosphoglyceratkinase (Glycolyse) (194).

Neben dem bereits erwähnten verminderten Sauerstoffverbrauch in den NF-Arealen (34) sind dort auch die Ischämieparameter Adenosin (125, 194) und Laktat (34, 125) unter Ruhebedingungen genauso wenig erhöht wie in HF-Arealen bzw. weisen bei identischer relativer Flussverminderung in Koronarstenose-experimenten einen vergleichbaren Anstieg (ab 50 % Perfusionsminderung beginnend) auf (20). In NF-Arealen kann somit durchaus auf ein ausgeglichenes Verhältnis von O<sub>2</sub>-Angebot und -Verbrauch geschlossen werden. Vielmehr scheint es so, dass ein gesteigerter ATP-Bedarf in den HF-Arealen diese im Falle einer Sauerstoffminderversorgung sogar anfälliger für Infarktereignisse macht (66). Disseminierte Nekrosen bei chronischen myokardialen Ischämien unterschiedlichster Genese könnten sich darüber erklären lassen.

### **1.2.2 Durchblutungsheterogenität und lokales Proteom**

Trotz der in Kap. 1.2.1 geschilderten Hinweise auf eine zeitliche Stabilität der räumlichen Blutflussheterogenität gab es im Vorfeld der im Folgenden einleitend umrissenen Studie (95, 117) keine Untersuchungen, welche dieses Phänomen über einen Zeitraum von mehr als 28 h (107) schon einmal quantitativ untersucht hatten. Um u. a. das Ausmaß der längerfristigen zeitlichen Stabilität des lokalen myokardialen Flusses zu erfassen, wurden daher bei 6 wachen instrumentierten Hunden die myokardialen Flussmuster über 13 Tage mittels der sequentiellen Applikation von 7 verschiedenfarbig fluoreszierenden Mikrosphären im zweitägigen Abstand ermittelt (Kap. 2.1.1).

Des Weiteren sollte mit Hilfe zusätzlicher Gaben von verschiedenen radioaktiven Mikrosphären am letzten Versuchstage u. a. hinterfragt werden, ob - wie in der anfangs erwähnten morphologischen Studie (194) geschehen - der Einfluss von Narkose bzw. sedierender Analgesie und Thorakotomie/Perikardiotomie auf das myokardiale Flussmuster bei Auswertung der Experimente weitgehend unberücksichtigt bleiben kann (Applikationsschema: <sup>46</sup>Sc → wache Hunde; <sup>153</sup>Gd → narkotisierte Hunde; <sup>113</sup>Sn → Hunde nach Thorako- und Perikardiotomie). Die radioaktive Strahlung des den wachen Tieren applizierten Scandium-Isotops wurde schließlich ebenfalls herangezogen, um die NF- und HF-Myokardproben



**Abb. 1.4 Ergebnisse des vorausgehenden Mikrosphärenexperimentes modifiziert nach (95).** A) Verteilung der Myokardproben nach ihrem normalisierten lokalen Blutfluss auf 25 Flussklassen sowie grundlegende Kenndaten der Untersuchung (Ruhebedingungen). B) Die räumliche Heterogenität des lokalen Blutflusses verdeutlicht anhand ausgewählter Schichten eines repräsentativen Herzens ( $^{46}\text{Sc}$ -Mikrosphären). C) Korrelationen von lokalen Blutflüssen zur Darstellung der Einflüsse von Zeit (links; hier: temporale Heterogenität über den gesamten Untersuchungszeitraum), Narkose (Mitte) und Thorako-/Perikardiotomie (rechts) auf die jeweiligen myokardialen Ausgangsflussmuster (ein repräsentatives Herz je Diagramm). Für Ordinate und Abszisse gilt die Einheit  $\text{ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ . CV = Variationskoeffizient. r = Korrelationskoeffizient. Vgl. auch Tab. 1.1.

für die sich später anschließende Proteomanalyse und ergänzende morphologische Studie zu identifizieren (Kap. 2.1.1). Abb. 1.4 gibt die für die Folgeuntersuchungen relevantesten Ergebnisse sowie grundlegende Kenndaten des Mikrosphärenexperimentes wieder. Ein Maß für die beobachtete räumliche Heterogenität ist der aus Mittelwert und zugehöriger Standardabweichung des myokardialen Flusses berechnete Variationskoeffizient (CV). Dieser war ausgeprägt und lag bei einer Auflösung von 295  $\mu\text{l}$  ( $n=7$  Herzen mit 1385 Proben) im Bereich 0,30 bis 0,41 mit einem Mittelwert von  $0,34 \pm 0,04$  (Abb. 1.4 A). Wurden bei Auswertung benachbarte Proben zum Erhalt einer 1 %igen Auflösung der freien linken Ventrikelwand gepaart (9), reduzierte sich der Wert auf 0,28.

Drei Flussmuster von ausgewählten transmuralen Schichten eines repräsentativen Herzens sind in Abb. 1.4 B graphisch dargestellt (Auflösung von 295  $\mu\text{l}$ ). Graustufen repräsentieren den am Mittelwert orientierten prozentualen lokalen  $^{46}\text{Scandium}$ -Fluss, wobei helle Areale NF- und dunkle Areale HF-Proben kodieren. Neben einer räumlichen Heterogenität der Flussverteilung innerhalb jeder Ebene (jeweilige CV-Angaben unter den Grafiken) ist auch die clusterartige Gruppierung von Niedrig- und Hochflussarealen zu erkennen.

Des Weiteren drückt sich der bereits angesprochene transmurale Gradient (4, 19, 21, 48, 194) hier in einem subendokardwärts gerichteten Anstieg des Blutflusses um 63,2 % (Subepikard:  $0,68 \pm 0,24$ ; Mesokard:  $1,06 \pm 0,29$ ; Subendokard:  $1,11 \pm 0,43$ ; Einheit:  $\text{ml min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) aus, wobei selbst diese im Literaturvergleich deutliche Änderung ungleich geringer ist als die um mehr als das dreifache variierende lokale Perfusion innerhalb der einzelnen Ebenen.

Die zeitliche Stabilität der räumlichen Heterogenität erwies sich über den 13-tägigen Beobachtungszeitraum als erstaunlich hoch. In Abb. 1.4 C (links) ist der lokale myokardiale Blutfluss eines repräsentativen Hundeherzens ( $n = 171$  Proben) zu Beginn des Experimentes gegen den des letzten Versuchstages aufgetragen, wobei ein Korrelationskoeffizient  $r$  von 0,95 ermittelt wurde. Bestimmt man für alle sechs in diesem Zusammenhang untersuchten Herzen die Korrelationskoeffizienten  $r$  von Tag 1, 3, 5, 7, 9 und 11 jeweils gegen Tag 13, so findet sich ein Gesamtmittelwert von  $0,89 \pm 0,13$  (King et al. gaben ihn bei einem etwa 28-stündigen Versuch an Pavianen mit  $0,86 \pm 0,07$  an) (107). Hierbei ist zu erwähnen, dass die einzelnen

Korrelationskoeffizienten mit längeren Beobachtungszeiträumen kaum abnehmen (mittlerer  $r_{\text{Tag 1 vs. Tag 13}} = 0,84 \pm 0,04$ ; mittlerer  $r_{\text{Tag 11 vs. Tag 13}} = 0,81 \pm 0,17$ ) und auch nur geringfügig unter dem in Durchläufen mit Simultangaben zweier fluoreszierender Mikrosphärensorten (n=2 Hunde) ermittelten methodischen Korrelationskoeffizienten von  $0,87 \pm 0,04$  angesiedelt waren.

Ein häufiger verwendetes Maß für die temporale Stabilität des myokardialen Flussmusters jedoch ist der zeitliche Variationskoeffizienten  $CV_{\text{temp}}$ . Dieser lag für alle 6 Herzen zwischen 0,04 und 0,20 mit einem Mittelwert von  $0,12 \pm 0,06$ , was ebenfalls mit den Resultaten der Arbeitsgruppe um King ( $CV_{\text{temp}} = 0,11$ ) (106) und auch mit anderen Ergebnissen kürzerer Studien ( $CV_{\text{temp}} = 0,09-0,14$ ) (21, 78, 107, 191, 194) übereinstimmt. Zusammen mit  $CV_{\text{meth}} = 0,07 \pm 0,06$  (methodischer Variationskoeffizient; ermittelt in den bereits erwähnten Durchläufen mit Simultangaben zweier fluoreszierender Mikrosphärensorten [n=2 Hunde]) und  $CV_{\text{obs}} = 0,36 \pm 0,06$  (beobachteter räumlicher/spatialer Variationskoeffizient; hier ebenfalls ermittelt mit fluoreszierenden Mikrosphären [n=6 Hunde]; das bei Verwendung der  $^{46}\text{Sc}$ -Mikrosphären [n=7 Hunde] erhaltene Pendant lag zur Erinnerung bei  $0,34 \pm 0,04$  [Abb. 1.4 A]) ermöglichte  $CV_{\text{temp}}$  auch die quantitativere Bestimmung eines um zeitliche und methodische Störgrößen bereinigten, wahren räumlichen Variationskoeffizienten  $CV_{\text{spatial}}$  mit  $0,33 \pm 0,07$  (es gilt:  $CV_{\text{spatial}}^2 = CV_{\text{obs}}^2 - [CV_{\text{temp}}^2 + CV_{\text{meth}}^2]$ ) (106, 107). Die wahre räumliche Heterogenität ist demnach nur wenig geringer als die beobachtete und annähernd dreimal so groß wie die temporale. Ihr Wert macht dabei beinahe das Fünffache des methodischen Variationskoeffizienten aus.

Der stabilen zeitlichen Heterogenität entsprachen schließlich auch grundsätzlich niedrige Fluktuationen ( $\hat{=}$  lokale temporale Variationskoeffizienten) des Blutflusses innerhalb einzelner Herzareale. Sie waren in den NF-Proben mit gemittelten 0,24 ( $\hat{=}$   $CV_{\text{NF}}$ ) etwa doppelt so groß wie in den HF-Arealen mit durchschnittlichen 0,12 ( $\hat{=}$   $CV_{\text{HF}}$ ; n=1 Herz mit n=26 ausgewählten Proben unterschiedlichen Flusses). Generell nahmen die Fluktuationen der Herzareale mit abnehmendem lokalen Mittelfluss zu. Auf Grund des niedrigen Flusses und Variationskoeffizienten erreichte die Durchblutung in Niedrigflussarealen dabei aber nur maximal 70 % des Mittelflusses. Niedrigflussareale wiesen somit nie einen Mittelfluss auf. Ebenso nahm die Durchblutung in Hochflussarealen nie auf Mittelflusswerte ab.

Während in der höchsten Flussklasse 99 % der Proben CV's von unter 0,25 aufwiesen, traf dies in der niedrigsten nur auf weniger als 70 % zu. Abschließend sei erwähnt, dass die bei diesem Experiment über einen 13-tägigen Beobachtungszeitraum ermittelten Fluktuationswerte nicht größer als die der etwa 28-stündigen Untersuchung von King et al. (106) waren.

Um herauszufinden, inwieweit sich Narkose und Thorakotomie/Perikardiotomie, auf die myokardiale Flussheterogenität auswirken, wurden die lokalen Blutflüsse wie oben beschrieben am wachen Tier, unter Narkose und nach Thorako-/Perikardiotomie mit radioaktiven Mikrosphären bestimmt (bei Narkose:  $^{153}\text{Gd}$ -Mikrosphären,  $n=7$  Hunde; nach Thorakotomie/Perikardiotomie:  $^{113}\text{Sn}$ -Mikrosphären,  $n=6$  Hunde). Für die wachen Tiere ( $^{46}\text{Sc}$ -Mikrosphären;  $n=7$  Hunde) ergaben sich als Ausgangslage (unter Ruhebedingungen) die schon aus Abb. 1.4 A bekannten und in Tab. 1.1 teilweise noch einmal aufgeführten durchschnittlichen (Vital-)Parameter. Pfeile in den Spalten 3 und 4 geben dabei je nach Anzahl die Stärke und Richtung der durch den Einfluss von Narkose und Thorakotomie/Perikardiotomie bedingten Änderungen an.

Mittlere (Vital-)Parameter des Experimentes	Wachzustand	Narkose	Thorako-/Perikardiotomie
Herzfrequenz (HF) [ $\text{min}^{-1}$ ]	$130 \pm 17$	↓↓ $82 \pm 19$	↓↓↓ $70 \pm 14$
systolischer Blutdruck ( $\text{BD}_{\text{sys.}}$ ) [mmHg]	$140 \pm 22$	↓↓ $98 \pm 13$	↓↓ $97 \pm 15$
Blutfluss (BF) [ $\text{ml min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ]	$1,12 \pm 0,33$	↓↓ $0,74 \pm 0,28$	↓↓ $0,75 \pm 0,24$
(beobachteter) räumlicher Variationskoeffizient ( $\text{CV}_{\text{obs}}$ )	$0,34 \pm 0,04$	↔ $0,32 \pm 0,05$	↔ $0,33 \pm 0,05$

**Tab. 1.1 Einflüsse von Narkose und Thorako-/Perikardiotomie auf die Versuchshunde.** Pfeile geben je nach Anzahl die Stärke und Richtung der Änderungen im Vergleich mit dem Wachzustand an. Vgl. Abb. 1.4 A.

Obwohl sämtliche Vitalparameter inklusive des Blutflusses während Narkose und nach Thorakotomie/Perikardiotomie erwartungsgemäß absanken, vermochte dies das durch  $\text{CV}_{\text{obs}}$  beschriebene Ausmaß der beobachteten räumlichen Blutflussheterogenität nicht zu verändern. Auch frühere ähnliche Studien u. a. von King et al. (58, 107, 133) fanden bei vergleichbaren Werten für  $\text{CV}_{\text{obs}}$  prima facie keine weitergehenden Flussunterschiede.

Zur Feststellung, ob darüber hinaus auch die Muster der Flussverteilung stabil bleiben, wurden daher die lokalen Blutflüsse der Versuchshunde im Wachzustand

gegen diejenigen in Narkose (Abb. 1.4 C Mitte zeigt 1 repräsentatives Herz mit  $r = 0,92$ ) bzw. nach Thorakotomie/Perikardiotomie (Abb. 1.4 C rechts zeigt das Herz mit dem geringsten  $r [0,46]$ ) korreliert. Im Narkoseversuch wurde dabei ein mittlerer Korrelationskoeffizient  $r$  von  $0,92 \pm 0,07$  ermittelt, was trotz der verminderten Herzfrequenz und des niedrigeren arteriellen Druckes für eine Stabilität des Flussmusters sprach. Die Thorakotomie bzw. Perikardiotomie hingegen führte bei 3 von 6 Hunden zu einem deutlichen Abfall von  $r$  mit einem Mittelwert von  $0,79 \pm 0,23$ . Während die Narkose noch keinen Einfluss auf die Flussverteilung hatte, veränderten sich die myokardialen Flussmuster demnach aber bei Eröffnung des Brustkorbes bzw. Herzbeutels.

Die in diesem Abschnitt beschriebene, mindestens 13 Tage andauernde zeitliche Stabilität des Flussmusters (NF- blieben NF- und HF- blieben HF-Areale) ließ auch bedeutende Unterschiede auf Ebene der lokalen Proteinexpression erwarten. Ein Ziel dieser Arbeit war es, derartige Unterschiede im lokalen Proteom der wie beschrieben selektierten NF- und HF-Areale zu ermitteln (vgl. Kap 1.4).

### 1.3 Funktionelle Bedeutung von Myoglobin bei Mäusen

Die zweite biologische Fragestellung, welche mit Hilfe des Proteomics-Ansatzes bearbeitet werden sollte, betraf die Auswirkungen eines Myoglobinmangels auf die kardiale Proteinexpression. In einer vorausgegangenen Studie (71) wurde bei Mäusen zunächst ein für die Myoglobinbildung wesentlicher DNA-Abschnitt entfernt (Myo<sup>-/-</sup>-Mäuse) und im Anschluss daran ihre Herzstruktur und -funktion mit der von Wildtyptieren (WT-Mäuse) verglichen. Es folgen erneut eine kurze Einführung in die Thematik mit Herausarbeitung des Ansatzpunktes für diese Arbeit.

#### 1.3.1 Einführung

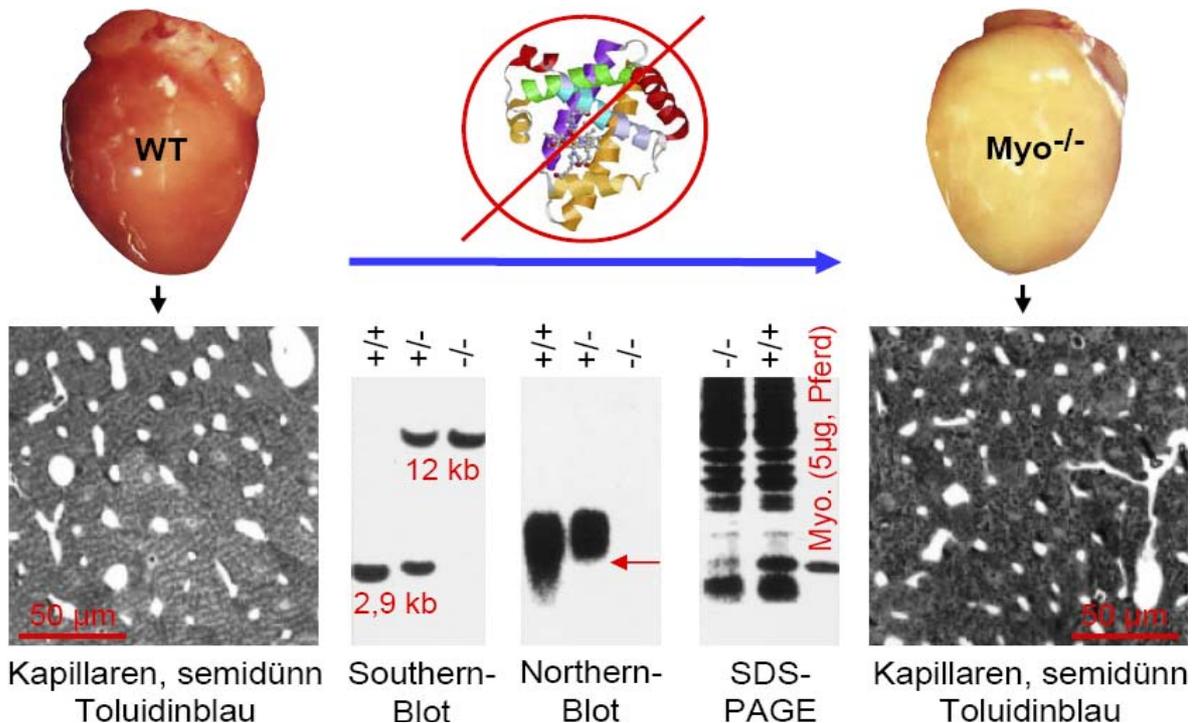
Myoglobin (Mb) ist ein monomeres, O<sub>2</sub> reversibel bindendes (O<sub>2</sub>-Halbsättigung bei einem P<sub>O<sub>2</sub></sub> von 2,3 mmHg) Häm-Protein (17 kDa, 153 Aminosäuren [AS]; vgl. Abb. 1.5), das bei Wirbeltieren hauptsächlich im Zytosol der Herz- und roten (ausdauernden) Skelettmuskulatur des Typs I und IIa vorkommt (223). Unter Ruhebedingungen (P<sub>O<sub>2</sub></sub> in den Kapillaren etwa 20-25 mmHg) liegt es weitgehend oxygeniert (MbO<sub>2</sub>) vor und kann so als kurzfristiger O<sub>2</sub>-Speicher fungieren bzw. O<sub>2</sub>-Schwankungen abpuffern (139, 140). Im teilweise desoxygenierten Zustand (z. B. zu 13 % bei einem P<sub>O<sub>2</sub></sub> von 8 mmHg in isolierten Kardiomyozyten) wird ihm eine die O<sub>2</sub>-Diffusion zwischen Sarkolemm und Mitochondrien erleichternde O<sub>2</sub>-Transporterfunktion („Facilitated Oxygen Diffusion“) (139, 198) - als Übersichtsartikel: (224) - zugeschrieben, deren genaue Bedeutung - vor allem *in vivo* - allerdings noch nicht abschließend geklärt ist (25, 97). Weitere Studien beschreiben u. a. seinen direkten Einfluss auf den NO-Stoffwechsel (MbO<sub>2</sub> baut reaktive O<sub>2</sub>-Spezies wie NO zu NO<sup>3-</sup> ab und wird selber zu metMb) (53, 54, 56) – als Übersichtsartikel: (158) - und schreiben Myoglobin auch eine Rolle bei der Regulation der oxidativen Phosphorylierung zu (genauer Mechanismus unbekannt) (40, 81), wobei die experimentellen Daten zu Letzterem ebenfalls noch widersprüchlich sind (139).

Um die verschiedenen Funktionen des Mb's zu klären, wurde es in zahlreichen Untersuchungen akut chemisch inaktiviert, wobei Substanzen wie CO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Nitrit zum Einsatz kamen (25, 40, 139, 198). Die Verwendung dieser Chemikalien

ist jedoch nicht unproblematisch. So sind für das Nitrit inzwischen unspezifische, die Experimente beeinflussende Nebenwirkungen dokumentiert (68). Das CO wiederum hemmt bekanntermaßen alle Cytochrome, also auch die Cytochrom c-Oxidase und somit den O<sub>2</sub>-Verbrauch. Vor diesem Hintergrund stellen gentechnologische Ansätze mit „chronischer“ Inaktivierung des Mb's durch den „Knock out“ seines Schlüsselgenes eine interessante Alternative dar. 1998 wurden bei rekombinanten Mäusen mit gentechnologisch erzeugter Myoglobinefizienz von Garry et al. (64) jedoch keine grundlegenden phänotypischen Abnormalitäten festgestellt. Die Tiere waren fertil und vergleichbar leistungsfähig, was bei dieser Studie zu dem Schluss führte, dass Mb nicht essenziell für eine normale Herz- und Skelettmuskelfunktion sei.

### 1.3.2 Myoglobin-Defizienz und myokardiales Proteom

Gödecke et al. (71) stellten 1999 die F2-Generation einer separaten Myoglobin-Knockout-Mauslinie vor, bei denen unabhängig von der Vorgängerstudie (64)



**Abb. 1.5 Wildtyp- (WT) und myoglobinefiziente (Myo<sup>-/-</sup>) Mäuseherzen im Vergleich modifiziert nach Gödecke (71).** Beide Herzen wurden blutfrei perfundiert abgelichtet. Die Myoglobinefizienz drückt sich u. a. anhand spezifischer Bandenmuster im Southern- (10 μg verdauete DNA) und Northern-Blot (5 μg Gesamt-RNA) sowie in der SDS-PAGE (200 μg blutfreies Protein) aus. Je zwei repräsentative LM-Aufnahmen demonstrieren eine höhere Kapillardichte in Myo<sup>-/-</sup>-Herzen ( $4.140 \pm 140 \text{ mm}^{-2}$  zu  $3.111 \pm 400 \text{ mm}^{-2}$  im WT; je n=6 Mäuse; P < 0,01; vgl. Tab. 1.2). +/+ = WT. +/- = heterozygot mutiert. -/- = Myo<sup>-/-</sup>.

ebenfalls das Exon 2 (kodiert die für die Häm-Bindung verantwortliche AS-Sequenz) (16) des Mb-Gens durch eine Neomycin-Kassette ersetzt worden war (70, 71, 148, 225). Abb. 1.5 zeigt zwei unterschiedlich farbige Herzen (WT vs. Myo<sup>-/-</sup>) samt LM-Aufnahmen der Kapillaren sowie die Ergebnisse der den erfolgreichen Mb-Knockout belegenden Kontrollexperimente (anstelle eines Western-Blots genügte aufgrund der großen Proteinmengen im Falle des Mb's eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brilliantblau-Färbung; vgl. Abb. 3.6, Seite 55). Neben der lichtmikroskopisch morphologischen Untersuchung wurden auch herzfunktionelle Parameter nach Isolation und Langendorff-Perfusion (52) unter Ruhebedingungen sowie unter adrenerger Stimulation (50 / 200 nM Dobutamin) erhoben. Tab. 1.2 fasst die entsprechenden Ergebnisse zusammen. Zusätzlich sind einige im Vergleich interessanterweise nicht signifikant unterschiedliche Parameter, wie z. B. die via <sup>31</sup>P-NMR (52) ermittelten ATP- und Phosphokreatinkonzentrationen aufgeführt.

Anders als von Garry et al. (64) berichtet waren bei detaillierter Betrachtung demnach durchaus Kompensationsmechanismen zu beobachten. Diese führen letztlich vor allem zu einem steileren Po<sub>2</sub>-Gradienten hin zu den Mitochondrien der

Kompensationsmechanismen	WT	Myo <sup>-/-</sup>	Ergänzung
Koronarblutfluss [ml min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ]	6,4 ± 1,3	↑↑ 8,5 ± 2,4	je n=8; P < 0,05
Koronarreserve <sup>1</sup> [ml min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ]	17,1 ± 2,1	↑ 20,8 ± 1,1	je n=6; P < 0,05
Hämoglobinwert [g/dl]	13,3 ± 0,6	↑ 14,4 ± 0,5	n=8 (WT), n=9 (Myo <sup>-/-</sup> ); P = 0,02
cvPo <sub>2</sub> [mmHg] basal und bei Gabe von 50 / 200 nM Dobutamin	88 38° / 12,5°	↑↑ 123 ↑ 67° / ↑↑ 38°	je n=8; P < 0,05 (°)
Kapillardichte [mm <sup>-2</sup> ] (vgl. Abb. 1.5)	3.111 ± 400	↑↑ 4.140 ± 140 <sup>2</sup>	je n=6; P < 0,01
<b>Parameter ohne signifikante Veränderungen beim Vergleich WT vs. Myo<sup>-/-</sup> (↔)</b>			
Körpergewicht, Herzgewicht; Verhältnis von Herzgewicht und Körpergewicht; Herzfrequenz; LVP*; dP/dt <sub>max</sub> *; dP/dt <sub>min</sub> *; Hämatokrit; MCHC; O <sub>2</sub> -Verbrauch*; Gewebekonzentrationen von ATP*, PCr* und Cytochrom c-Oxidase; PCr/ATP-Ratio*; gesamte und perikapillare Mitochondriendichte			

**Tab. 1.2 Physiologische Reaktionen auf chronische Myoglobindeizienz nach Gödecke (71).** Messung der Funktionswerte unter Ruhebedingungen. Pfeile geben je nach Anzahl die Stärke und Richtung der Änderungen an. 1) Gemessen nach 20-sekündiger Koronarokklusion resp. intrakoronarer Stimulation mit 1µM Adenosin 2) Konsekutiv minderte sich die mittlere interkapillare Distanz in den Myo<sup>-/-</sup>-Herzen um etwa 2,5 µm (≈ -15 %). Die Ergebnisse bewegen sich damit im Rahmen der in Studien an Schweinen erzielten Werte zwischen 3.000 mm<sup>-2</sup> und 5.000 mm<sup>-2</sup> (101)  
\*) Zusätzlich auch bei adrenerger Stimulation mit 50 resp. 200 nM Dobutamin.

Muskelzellen. Alleine aus der im Myo<sup>-/-</sup> festzustellenden Steigerung der Kapillardichte um 33,1 % und dem um 8,3 % erhöhten Hämoglobinwert resultiert eine 44,1 %ige Zunahme der von Hoppeler et al. als wesentlich beschriebenen perimyozytären Erythrozytenkonzentration (90). Die Steigerung des Hämoglobinwertes ging bei gleich bleibender MCHC („Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration“) mit einer (nicht signifikanten) Erhöhung des Hämatokritwertes von  $49,1 \pm 3,3$  % auf  $52,5 \pm 4,3$  % einher. Aus der Zunahme des Koronarblutflusses bei den Myo<sup>-/-</sup>-Mäusen schließlich folgte vor dem Hintergrund eines unveränderten O<sub>2</sub>-Verbrauches ein konsekutiver Anstieg des koronarvenösen P<sub>O<sub>2</sub></sub>'s (cvP<sub>O<sub>2</sub></sub>).

Noch vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde in weiteren Untersuchungen an Myo<sup>-/-</sup>-Mäusen der oben beschriebenen Zucht auch eine höhere Sensitivität für NO-Stimuli (NO wird durch Mb abgebaut) (56) nachgewiesen. Auch fand sich in Myo<sup>-/-</sup>-Herzen nach Ischämiebeginn erwartungsgemäß ein rascherer Abfall der kontraktilen Kraftentwicklung sowie ein trotz geringerer Myozytendurchmesser erhöht anzunehmender Diffusionswiderstand für O<sub>2</sub> mit konsekutiv verringertem O<sub>2</sub>-Verbrauch (139). Eine Forschergruppe um Garry wies in Folgeexperimenten bis 2001 ebenfalls Adaptationsmechanismen bei ihren Myo<sup>-/-</sup>-Versuchstieren nach (76) – als Übersichtsartikel: (63). So fanden sich in der Skelettmuskulatur (*Musculus soleus*) u. a. vermehrt Muskelfasern des Typs II (schnell; weiß) anstelle von I (ausdauernd; rot) (76). Mittels RT-PCR wurde darüber hinaus eine erhöhte Expression des HIF 1 $\alpha$  und des HIF 2 („Hypoxia-Inducible Transcription Factors“) nachgewiesen (76, 136). In Kombination vermögen diese beiden Faktoren per Genaktivierung die Bildung von Mediatoren einer verbesserten O<sub>2</sub>-Versorgung (z. B. den VEGF [„Vascular Endothelial Growth Factor“] sowie die NOS) zu induzieren – als Übersichtsartikel: (189). Ebenfalls durch HIF 1 $\alpha$  und HIF 2 induziert werden einige Glykolyseenzyme sowie Glukosetransporter, was nicht zuletzt der ATP-Produktion unter O<sub>2</sub>-Mangel förderlich ist (189). Schließlich konnte im Jahre 2001 auch das durch Herzversagen bedingte Absterben von nicht rechtzeitig adäquat adaptierten Myo<sup>-/-</sup>-Mäuseembryos *in utero* gezeigt werden (136).

Die offensichtlich (lebens-)notwendigen Kompensationsmechanismen im Myo-/sprechen für eine sehr wohl bedeutende Rolle des Mb's in Bezug auf die Herz- und Skelettmuskelfunktion unter Normalbedingungen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, das myokardiale Proteom auf weitere Adaptationen an die Myoglobindefizienz hin zu untersuchen suchen und somit weitere Einblicke in die Funktion/Bedeutung des Mb's zu gewinnen (vgl. Kap 1.4).

## 1.4 Ziele der Untersuchungen

- 1) Vor Durchführung der myokardialen Proteomanalysen musste die Methodik mit Hilfe von explorativen Experimenten zunächst optimiert werden. Hierzu wurden u. a. n=6 silbergefärbte Gele von nur einer Hundeherzprobe hergestellt. Die statistische Auswertung war Grundlage für die Bewertung der Methodik bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit bei der Detektion wahrer Proteinexpressionsunterschiede und half so bei der Aufstellung wesentlicher Kriterien (Kap. 2.3.1) für das spätere experimentelle Vorgehen.
- 2) Die in Kap. 1.2 beschriebene Heterogenität des myokardialen Blutflusses, Metabolismus und Energieumsatzes sowie insbesondere die Ergebnisse der vorausgegangenen Mikrosphärenstudie (95, 117) mit Feststellung einer bemerkenswerten, mindestens 13 Tage andauernden zeitlichen Stabilität des Flussmusters (NF- blieben NF- und HF- blieben HF-Areale) ließen auch bedeutende Unterschiede auf Ebene der lokalen Proteinexpression erwarten. Diese sollten per myokardialer Proteomanalyse anhand von je n=30 zweifach bestimmten NF- bzw. HF-Proben aus n=6 Hunden erfasst werden.
- 3) In den meisten früheren Akutversuchen zur Flussheterogenität wurden die Versuchstiere häufig erst nach erfolgter Thorakotomie bzw. Perikardiotomie instrumentiert, um dann die Experimente durchzuführen. Dies könnte vor dem Hintergrund des ebenfalls in der vorausgegangenen Studie (95) gefundenen Einflusses der Thorako-/Perikardiotomie auf das myokardiale Flussmuster zu falschen oder ungenauen Selektionen der NF- und HF-Areale geführt haben. Auch die grundlegende Annahme der morphologischen Äquivalenz von NF- und HF-Arealen beruht auf einer nach diesem Schema durchgeführten Untersuchung (194) und sollte daher in einer erneuten morphologischen Studie an einem Hund bezüglich myokardialer Kapillaren (n=288 Semidünnschnitte) und Mitochondrien (n=288 EM-Aufnahmen) überprüft werden.

- 4) Myoglobin-defiziente sind fertil, vergleichbar leistungsfähig und zeigen keine grundlegenden phänotypischen Abnormalitäten (64, 71). Anders als in einer früheren Studie (64) vermutet, ist die Rolle des Myoglobins für eine normale Herz- und Skelettmuskelfunktion dennoch nicht zu unterschätzen, da seine Abwesenheit u. a. eine Reihe von den  $P_{O_2}$ -Gradienten zu den Mitochondrien der Muskelzellen steigernden Kompensationsmechanismen induziert (71). Vielmehr scheint die rechtzeitige Ausbildung dieser Kompensationsmechanismen (lebens-)notwendig für eine adäquate Entwicklung der Versuchstierembryos *in utero* zu sein (136). In einer zweiten Proteomanalyse mit n=12 WT- und n=12 Myo<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen (jeweils Zweifachbestimmung) (71) sollte anhand des Proteinexpressionsmusters nach weiteren Adaptationen an die Myoglobindefizienz gesucht werden, um somit weitere Einblicke in die Funktion/Bedeutung des Mb's zu gewinnen

## **2 Material und Methoden**

Sämtliche Untersuchungen an Beagle-Hunden und Mäusen wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde, des Regierungspräsidenten Düsseldorf und in Einklang mit den von der American Physiological Society befürworteten „Guiding Principles in the Care and Use of Animals“ durchgeführt.

Kap. 2.1.1 und 2.2.1 erläutern die außerhalb dieser Arbeit im Rahmen der einleitend erwähnten Studie zur Heterogenität der myokardialer Durchblutung (95, 117) (Kap. 1.2) durchgeführte Probengewinnung.

### **2.1 Differential-Display-Proteomanalyse**

Die im Folgenden beschriebenen Schritte der Proteomanalyse beziehen sich weitestgehend sowohl auf die Untersuchung zur Durchblutungsheterogenität als auch auf die Untersuchung zur Myoglobindefizienz. Abwandlungen bei Letzterer sind am Ende der entsprechenden Unterkapitel in eigenen Abschnitten dargestellt.

#### **2.1.1 Bereitstellung des Untersuchungsmaterials**

Im Zuge der vorausgegangenen Studie zur Stabilität der räumlichen und temporalen Heterogenität myokardialer Durchblutung (95, 117) (Kap. 1.2) wurden für die Proteomanalyse Proben aus der freien Wand des linken Ventrikel von sieben Beagle-Hunden zur Verfügung gestellt. Beagle Nr. 7 diente hierbei in weiterführenden Untersuchungen ausschließlich der Bestätigung zuvor erhobener Daten (Kap. 4.1.1 und 4.2.1). An Tier Nr. 8 wurde eine ergänzende morphologische Untersuchung durchgeführt (Kap. 2.2). Alle Hunde (Tab. 2.1) waren Züchtungen der eigenen Tierversuchsanlage (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland) bzw. wurden von Hoechst/Aventis Frankfurt, Deutschland bezogen.

Beagle	Alter	Geschlecht	Gewicht	Zeitraum <sup>1</sup>
1	9 Jahre	weiblich	20 kg	26.1.-16.2.2000
2	8 Jahre	weiblich	19 kg	26.1.-16.2.2000
3	6 Jahre	weiblich	22 kg	30.3.-19.4.2000
4	6 Jahre	weiblich	21 kg	31.5.-21.6.2000
5	10 Jahre	männlich	20 kg	13.9.-6.10.2000
6	5 Jahre	männlich	21 kg	13.9.-6.10.2000
7	5 Jahre	männlich	19 kg	21.11.-14.12.2000
8	10 Jahre	männlich	18 kg	11.6.-25.6.2001

**Tab. 2.1 Versuchshunde.** Die Herkunft der Tiere ist obigem Text zu entnehmen.  
1) Katheterimplantation bis Entnahme des Herzens.

Im Vorfeld waren den Hunden nach 10-tägigem Training zur Gewöhnung an die Kontaktpersonen sowie präoperativem Fasten je ein Katheter in den linken Herzvorhof und die *Pars descendens* der Aorta platziert worden (95, 144). Perioperativ wurden die Tiere kontinuierlich antibiotisch abgedeckt und beide Katheter nach dem Eingriff regelmäßig unter sterilen Kautelen mit physiologischer NaCl-Lösung gespült sowie zur Thromboseprophylaxe mit dieser und Heparin gefüllt.

Im Anschluss an eine von der Wundheilung abhängige, mindestens jedoch 8-tägige postoperative Erholungsphase wurden den Hunden 1-7 (weiteres Prozedere Hund 8: Kap. 2.2) über einen Zeitraum von 13 Tagen mittels des Vorhofkatheters siebenmalig (Hund 3: sechsmalig) verschiedenfarbig fluoreszierende Mikrosphären appliziert. Während der Gabe ließ sich dabei durch die gleichzeitige Blutabnahme über den Aortenkatheter ein Referenzorgan simulieren. Herzfrequenz, Blutdruck und Hämatokrit wurden regelmäßig gemessen und dokumentiert

Am letzten Versuchstage erfolgte unter Blutdruckkontrolle zusätzlich eine simultane Gabe von radioaktiv markierten Mikrosphären (u. a.  $^{46}\text{Sc}$ ;  $t_{1/2} = 83,8\text{d}$ ) Erst danach schloss sich in Intubationsnarkose (34) die Thorakotomie zur Entnahme der freien linken Ventrikelwand an (genauer: Kap. 2.2.1). Das Gewebe wurde für 2 s in eisgekühlte NaCl-Lösung getaucht, mit flüssigem Stickstoff zwischen zwei vorgekühlten Kupferblöcken schockgefroren und schließlich für

48 h lyophilisiert. Aus jedem Herzen wurden in einem standardisierten Verfahren durchschnittlich  $198 \pm 23$  Proben mit einem Trockengewicht von  $59,4 \pm 19,4$  mg präpariert und ihrer Topographie entsprechend codiert. Dabei entstanden jeweils zwei [Subepikard/Subendokard; Hunde 1-3] bzw. vier [zusätzlich Mesokard I und II; Hunde 4-7] transmurale Schichten mit theoretisch jeweils  $8 \times 8$  gleichen Anteilen.

Für die hier relevanten Untersuchungen zur Proteinexpression und Morphologie ermöglichte nach ihrer Messung im  $\gamma$ -Counter die Strahlung der radioaktiven Mikrosphären gemäß Formel 2.1 eine Selektion (34, 178) der Niedrig- resp. Hochflussareale (lokaler Blutfluss  $< 50$  % [NF] gegenüber  $> 150$  % [HF] des myokardialen Mittelflusses) ohne dass die Gewebeproben eigens dafür homogenisiert werden mussten.

$$\text{Fluss [ml/min]} = \frac{\text{rad.Intensität}_{\text{Probe}} [\text{ccpm}]}{\text{rad.Intensität}_{\text{Referenz}} [\text{ccpm}]} \cdot 10 [\text{ml/min}] \quad (\text{F 2.1})$$

Wie oben bereits beschrieben wurde auch hier die Referenz durch eine gleichzeitige Blutabnahme über den Aortenkatheter simuliert. Alle Proben wurden bei  $-80$  °C gelagert

Die Proteomanalyse der Folgen muriner Myoglobindefizienz hingegen wurden an den Herzen von  $n=12$  entsprechenden eigenen Zuchttieren (Myo<sup>-/-</sup>) (71) sowie  $n=12$  dem Vergleich dienenden Wildtyp-Mäusen (WT) durchgeführt. Alle Tiere waren weiblichen Geschlechts und zum Zeitpunkt der Untersuchung etwa 3 Monate alt.

### 2.1.2 Aufbereitung der Proben

Bei durchgehender Eiskühlung wurde das gefriergetrocknete Gewebe der Hunde zunächst mit der Schere weiter zerkleinert, um es dann mit 2 ml  $10^{\circ}\text{C}$  kaltem Lysispuffer (9,5 m Harnstoff als Chaotrop zur Denaturierung der Proteine (180); 2 % CHAPS als zwitterionisches, im elektrischen Feld nicht wanderndes Detergenz zur Verbesserung der Löslichkeit hydrophober [Membran-]Proteine;

40 mM Tris als schwache Base zur Inhibierung vieler Proteasen durch Einstellung des pH-Wertes auf 8-10; 1 % frisches DTT [Thiolgruppen] zur Verhinderung der Oxidation durch Luftsauerstoff; Aqua bidest. zum Auffüllen; Angaben in % beziehen sich im Folgenden je nach Aggregatzustand auf das Volumen oder die Masse der jeweiligen Endlösung mit einer angenommenen Dichte von 1g/ml) für 30 min zu rehydratisieren. Danach wurde die Probe für 2 min mit einem Homogenisator weiter gelöst. Auf eine erneute Gabe von 3 ml Lysispuffer - diesmal ohne DTT-Zusatz - folgte eine Wiederholung des Homogenisierens für 5-10 min.

Nach Entnahme von 500 µl und Überführung in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß wurde das restliche Homogenat zusammen mit 15 ml Waschpuffer (2 % Tween<sup>®</sup> 20 als nicht-ionisches Detergens; 0,05 % Antifoam SO-25 als Schaumverhütungsmittel; Aqua bidest. [18,2 MΩcm; Milli-Q Plus, Millipore, Molsheim, Frankreich]) zur Extraktion der fluoreszierenden Mikrosphären (Kap. 2.1.1) in ein 20ml-Szintillationsgefäß gegeben. Der Inhalt der Eppendorf-Cups wurde zentrifugiert (10 min bei 14.000 rpm und 4 °C), der Überstand zu 100 µl aliquotiert und nach Ausschluss überdurchschnittlicher Reststrahlung im γ-Counter (Normalwert: 5-20 ccpm bzw. nur etwa 1 ‰ des Ausgangswertes) erneut bei -80 °C gelagert. Das radioaktive Mikrosphären enthaltende Sediment wurde abschließend ordnungsgemäß entsorgt.

Den Mäusen wurde nach Durchtrennung des zervikalen Rückenmarkes und sofortiger Thorakotomie PBS-Lösung zur Perfusion (150 mM NaCl; 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O; pH 7,5; RT) in den linken Ventrikel injiziert. Im Anschluss an ihre Exzision wurden die Herzen gewogen und ebenfalls für 5 min in Lysispuffer (1:10, w/v) homogenisiert. Der Zentrifugation (s. o.) folgend wurden Aliquots zu 50 µl gebildet und bei -80 °C gelagert.

### **2.1.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Die IEF wurde mit dem IPGphor-System und 18 cm langen nicht linearen immobilisierten pH-Gradientenstreifen (IPG's) für den pH-Wertbereich 3-10 durchgeführt (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Der nicht

lineare Gradient sorgte hierbei für eine gedehnte Darstellung derjenigen Proteine mit einem IEP zwischen pH 5 und 7 (Abb. 3.2).

Die Analyse immer äquivalenter Proteingehalte wurde zunächst durch eine an Bradford angelehnte Proteinbestimmung (18) sichergestellt. Hierbei diente der durch Proteinkontakt hervorgerufene und weitgehend linear zur Proteinmenge verlaufende Farbumschlag des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau G 250 (10 %; weitere Zusätze: 8,5 % Phosphorsäure, 4,75 % Ethanol, A. bidest.; Filtration durch Faltenfilter; je 2 ml auf 15 µl Probe in 30 µl Lysispuffer [s. o.]; Leerwert ohne Puffer), welcher für jede Messreihe erneut mit Hilfe einer BSA-Eichreihe (15 µl bovines Serumalbumin Fraction V; 0,5/1/2/3/4/5 mg/ml) nach 15 min bei 595 nm dreifach im Spektrometer (Lamda 20, PERKIN ELMER, Norwalk, CT USA) quantifiziert wurde. Bei späteren Experimenten erfolgte diese Bestimmung mit Modifikationen nach Ramagli (171), um potentiell störende Einflüsse basischer Reagenzien wie beispielsweise Harnstoff zu mindern.

Das somit zu ermittelnde erforderliche Volumen an Probenhomogenat wurde durch komplementäre Gabe von Probenpuffer (8 M Harnstoff; 1 % CHAPS; 0,3 % DTT; 0,5 % frisches Pharmalyte pH 3-10 NL als zwitterionischer IPG-Puffer zur Verbesserung der Leitfähigkeit des Streifens sowie der Proteinlöslichkeit; Spuren von Bromphenolblau zur Kontrolle des korrekten Elektrodenkontaktes durch Wanderung in Richtung Anode; A. bidest.; Lagerung bei -20 °C) zu einer stets 420 µl ausmachenden Probenlösung ergänzt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugation (10 min bei 14.000 rpm und 10 °C) zur letzten Entfernung unlöslicher Substanzen ließen sich jeweils 350 µl Überstand in die Keramikhalter der IPG-Streifen (Strip Holder) pipettieren. Dabei betrug die Proteinmasse im Falle der Hundeherzen 120 µg für jedes analytische und 1,5 mg für jedes präparative (Kap. 2.1.6) Gel. Die IPG-Streifen wurden nach dem Abziehen der Schutzfolie unter Entfernung der Luft einschlüsse mit nach unten weisender Gelseite über der Probenlösung positioniert. Die spitze Seite des niedrigen pH-Bereiches musste hierbei in Richtung Anode zeigen und ein beidseitiger Elektrodenkontakt war sicherzustellen. Abschließend wurden die Streifen mit öligem IPG-Cover-Fluid überschichtet, der Strip-Holder mit einem Deckel verschlossen. Die Fokussierung auf der IPGphor-Einheit erfolgte mit

50  $\mu$ A je Streifen und einem Minimum von 80.000 Voltstunden nach folgendem Protokoll:

Arbeitsschritt	Spannung [V]	Dauer [h]
Rehydratation des Gelstreifens	0; 30 während der letzten 6 h	12
Schritt 1	500	1
Schritt 2	1000	1
Schritt 3	8000	10
Schritt 4 <sup>1</sup>	500-1000	bis 15

**Tab. 2.2 Protokoll der IEF.** 1) Schritt 4 diente lediglich der Lagerung (z. B. über Nacht) und hielt die Proteine an ihrem IEP fixiert.

Das Anlegen einer Spannung von 30 V schon während der Rehydratationsphase sollte dabei den Übertritt problematisch großer Proteine ab einem Molekulargewicht von etwa 140 kDa in das Gel verbessern (73, 74). Fokussierte Streifen wurden zwischen zwei Plastikfolien bei -80 °C gelagert.

Unter Anlehnung an die oben beschriebene Vorgehensweise waren bei der Untersuchung der Mäuseproben folgende Unterschiede von Bedeutung: IPG-Streifen pH 3-10 linear; 150  $\mu$ g (analytische Gele) bzw. bis zu 2 mg (präparative Gele) Protein in 450  $\mu$ l Probenlösung.

### 2.1.4 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die 2D-SDS-PAGE wurden vertikale Hoefer SE 600 (kleine Gele) bzw. SE 660 (größere Gele) Elektrophoreseeinheiten (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet.

Lediglich die Analyse der ersten beiden Hundeherzen erfolgte mit 13 %igen Polyacrylamidgelelen in den Abmessungen von 1 mm  $\times$  17 cm  $\times$  16 cm (130 ml/4 Gele), bei den restlichen Proben wurde die Auflösung der zweiten Dimension gesteigert (1 mm  $\times$  17 cm  $\times$  24 cm; 170 ml/4 Gele). Die größeren Gele wurden mit eigens angefertigten Gelcastern samt Zubehör gegossen. Während der Herstellung war auf die Verwendung sorgfältig mit Seifenlauge

(Cleaning solution) und A. bidest. gereinigter Glasplatten, Spacer, Dichtungen, etc. zu achten. Präparative Gele wurden hierbei im Hinblick auf die massenspektrometrische Analyse nicht mit Metallsalze bildenden Detergenzien in Kontakt gebracht (128). Frisch gegossene Gele wurden zur Verhinderung einer Meniskusbildung mit 1 ml wassergesättigtem 1- oder iso-Butanol (50 g; 5 g A. bidest.) überschichtet. Als Schutz vor Austrocknung bei nächtlicher Lagerung im Kühlschrank (Sicherstellung vollständiger Polymerisation) diente Abdeckfolie und Gellagerungslösung. Der verwendete Elektrodenpuffer entsprach dem auch bei diskontinuierlichen Elektrophoresen eingesetzten System nach Laemmli (114).

Bevor die IPG-Streifen auf die Polyacrylamidgele übertragen werden konnten, war ihre Äquilibration erforderlich. In einem ersten Schritt erfolgte dies durch 15-minütiges Plazieren auf einem Schüttler (Swip KL-2, Edmund Bühler/Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland) im Inneren einer Röhre (Teflon-Reswelling-Tray) zusammen mit jeweils 5 ml Äquilibrationpuffer, dem kurz zuvor 1 % DTT zugesetzt worden war. Die Proteine auf der nach innen zu richtenden Gelseite wurden durch den Kontakt mit der DTT-SDS-Lösung erneut reduziert und für die PAGE entfaltet. Hierbei entstandene reaktive Cysteingruppen sollten dann im zweiten Schritt, bei dem selbiges Prozedere mit 2,5 % Iodacetamid anstelle von 1 % DTT durchgeführt wurde, irreversibel zu Carbamidomethylcystein derivatisieren, um Artefaktbildungen sowohl bei der Färbung als auch bei der Massenspektrometrie zu vermeiden (vgl. „Mascot“-Recherche in Kap. 2.1.7)

Äquilierte IPG-Streifen wurden kurz in Elektrodenpuffer getaucht, an der basischen stumpfen Seite auf 17 cm gekürzt und durch Agarose-Siegellösung mit am Glas anliegender Trägerfolie über den Gelen fixiert. Jeweils vier Gele wurden simultan innerhalb von 5-6 h unter permanenter Wasserkühlung entwickelt. Um den Übertritt der Proteine aus der ersten in die zweite Dimension zu erleichtern, betrug die Stromstärke in den ersten 15 min 15 und erst nach dieser Phase 30 mA.

Tab. 2.3 ist die Zusammensetzung aller im Zuge der Elektrophorese benötigten Komponenten zu entnehmen.

Komponente	Zusammensetzung	Bemerkung
100 ml Polyacrylamid-gel (13 %)	43 ml Acrylamid/Bis-Monomer-Stocklösung (30 %; Fertiglösung 29:1)	cave: neurotoxische Wirkung; bei RT mit Magnetrührer verarbeiten
	25 ml Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
	1 ml SDS (10 %)	entfaltet und lädt Proteine negativ
	500 µl frisches APS (10 %)	nach Zugabe Verfestigung des Geles durch radikalische Polymerisation in bis zu 2 h
	33 µl TEMED	
Gellagerungs-Lösung	25 % Trenngelpuffer; 10 % SDS-Lösung	zur Lagerung der Gele über Nacht im Kühlschrank
Elektroden-puffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3 ohne HCl	insgesamt 5 l pro Durchgang; zweimalig verwendbar
SDS-Äquibrierungs-puffer	3,35 % Trenngelpuffer; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 2 % SDS; Spuren v. Bromphenolblau	2 × 5 ml je IPG-Streifen zur Vorbehandlung; Lagerung bei -20 °C
Agarose-Siegellösung	0,5 % Agarose Typ VII-A (low gelling temperature) in Elektrodenpuffer; Spuren v. Bromphenolblau	zur Fixierung der IPG-Streifen; vor Gebrauch 1,5 min in der Mikrowelle verflüssigen

**Tab. 2.3** Komponenten der SDS-PAGE (Auffüllen aller Ansätze mit A. bidest.).

Bei Untersuchung der Mäuse kam das ETTAN-DALT II-System (selber Hersteller) für 12 vertikale Gele der Abmessung 1 mm × 25,5 cm × 24 cm (950 ml/14 Gele) zum Einsatz. Nach Befüllung des für 23 Gele ausgelegten DALT Multiple Gel Casters mit Acrylamidlösung musste diese zunächst durch Zugabe einer dichteren Platzierungslösung (25 g Trenngelpuffer [s. o.]; 50 g 87 %iges Glycerin; 25 g A. bidest.; Spuren von Bromphenolblau) von unten in Position gehoben werden.

Es ergaben sich weitere Modifikationen wie folgt: 7,5 l Elektrodenpuffer je Durchgang; 2 × 10 ml Äquibrierungspuffer pro IPG-Streifen; Elektrophorese mit 2,5 W/Gel für 30 min und 18 W/Gel für 4,5 h bei 25 °C.

### 2.1.5 Färbung und densitometrische Auswertung der Gele

Um die Gele auswerten zu können, wurden die Proteine zunächst einer modifizierten Silberfärbung nach Blum (17) unterzogen. Trotz bekannter Störanfälligkeit wurde die Silberfärbung aufgrund der typisch geringen Nachweisgrenze von etwa 10 ng Protein pro Gelspot bevorzugt.

Schritt	Zusammensetzung <sup>1</sup>	Einwirkdauer
1) Fixierer I	Essigsäure 10 %; Methanol 40 %	>1 h; ggf. über Nacht
2) Fixierer II	Ethanol 30 %	3 x 20 min
3) Fixierer III*	Natriumthiosulfat 0,02 %	1 min
4) Silbernitrat (frisch)*	Silbernitrat 0,2 %; 37 %iges Formaldehyd 0,02 %	nach 20 min entsorgen
5) Entwickler	Natriumcarbonat 3 % 37 %iges Formaldehyd 0,05 % Natriumthiosulfat 0,0005 %	ca. 5 min; Lösung bei beginnender Hintergrundfärbung abkippen
6) Stopp-Lösung*	Glycin 0,5 %	5 min
7) Aqua dem.	Ø	2 x 5 min; ggf. über Nacht

**Tab. 2.4 Schritte der Silberfärbung.** 1) Auffüllen der Ansätze mit Aqua dem. \*) Im Anschluss 3 x 20 s gründlich mit Aqua dem. abspülen.

Gemäß Tab. 2.4 wurden 4 Gele in zwei Plastikschaalen passender Größe abwechselnd entwickelt. Während die Füllmenge der einzelnen Färbungslösungen jeweils dem 4-5-fachen Gelvolumen entsprach, lag der Gesamtverbrauch an demineralisiertem Wasser zur Zwischenspülung in Abhängigkeit der verwendeten Schalen zwischen 5 und 10 l. Zum Funktionsprinzip der Färbung siehe Kap. 1.1.3.

Gefärbte Gele wurden mit einem zuvor kalibrierten (Photographic Step Tablet No. 2, Kodak, Rochester, NY USA) Scanner (PowerLook III, UMAX, Fremont, CA USA) und der Software Labscan 3.0 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in den Modi „8 Bit-Scale“ sowie „Blue Channel“ bei einer Auflösung von 300 dpi digitalisiert.

Der sich anschließenden Auswertung diente die Software ImageMaster 2D Elite 3.01 (Amersham Pharmacia Biotech, s. o.). Für die Spoterkennung wurde mit den Parametern Sensitivity = 6,0-7,0 und Operator Size = 60-70 bei geringem „Background Factor“ zur Minimierung von Artefakten verfahren. Auf einem

durchschnittlichen Gel des Hundes (NF und HF) mit ca. 900 erkennbaren Spots lag nach intensiver manueller Korrektur die Anzahl der zuverlässig erfassten Spots bei  $380 \pm 79$  (Mäuse: Myo<sup>-/-</sup> und WT: 1200;  $461 \pm 22$ ; auch: Kap.0). Mehrere repräsentative Gele dienten dem Erstellen eines 770 Spots umfassenden Referenzgels (Mäuse: 599), auf dessen Grundlage äquivalenten Proteinen eine identische Referenznummer zugewiesen werden konnte. Der Spoterfassung vergleichbar bedurfte auch dieses von der Software unterstützte „Matching“ (Vector Size Box = 12; Search = 90) aufwendiger manueller Korrekturen. Die Anzahl der in allen Gelen von Hochfluss- und/oder Niedrigfluss-Proben des Hundes vertretenen Spots betrug hierbei 216. Im Falle der Mäuse mit einheitlichen, größeren und hinsichtlich des Gießens sowie der Elektrophorese in höherer Stückzahl simultan hergestellten Gelen lag dieser Wert bei 373 bezüglich Myo<sup>-/-</sup> resp. WT.

Den erfassten Proteinen wurde nach Subtraktion ihres Hintergrundes („Mode of Nonspot“ [Kap.3.1.1]; Hunde = 17 pixel/Mäuse = 45 pixel) ein so genanntes Spotvolumen zugeordnet, welches dem Produkt aus Spotfläche und mittlerem Grauwert entsprach. Vor der statistischen Auswertung wurden diese Volumina zur Kompensation möglicher auf die Gelfärbung zurückzuführenden Unterschiede normalisiert, indem man sie durch die Summe der Volumina weiterer Spots dividierte. Solche weiteren Spots waren bei Auswertung der Hundegele 29 in vorausgegangenen explorativen Experimenten (auch Kap. 3.1.1) als intensitätsstabil bestimmte Proteine ( $\Delta$ Spotvolumen Niedrigfluss/Hochfluss oder vice versa  $< 10\%$ ;  $\sigma < 25\%$ ) bzw. alle restlichen Proteine in den Mäusegelen („Total Spot Volume Normalisation“; Scaling Factor = Multiply by total area).

### **2.1.6 Schritte der Peptidsequenzanalyse mit ESI-MS/MS**

Für die Identifikation interessierender Proteine erfolgte wie im Falle der densitometrischen Auswertung zunächst deren Färbung - diesmal mit Coomassie-Brillantblau R 250. Der durch das Fehlen zweier Methylgruppen von der bereits erwähnten G 250-Variante (siehe Proteinbestimmung Kap. 2.1.3) zu unterscheidende Farbstoff lagert sich den Proteinen weitgehend linear zu deren

Menge durch sowohl unspezifisch hydrophobe als auch auf Sulfonatgruppen beruhende elektrostatische Wechselwirkungen an und kennzeichnet mit einer weniger sensitiven Nachweisgrenze von 0,1-1 µg bevorzugt solche Spotvolumina, welche massenspektrometrisch komplikationsarm zu analysieren sind.

Zu Beginn wurden mehrere präparative Gele (Maße immer 1 mm × 17 cm × 16 cm für eine höhere Proteinkonzentration/Spot; bis 2 mg Protein/Gel) zusammen mit Gelfärbelösung (0,1 % Coomassie-Brillantblau R 250; 40 % Methanol; A. dem.; 90 ml/Gel) und Essigsäure (10 ml/Gel zur Fixierung) für 1-2 h in Schalen entsprechender Größe gegeben (44). Auf die Entsorgung des Färbereagens folgte unter mehrmaliger Erneuerung die Zugabe von Gelentfärbelösung (20 % Ethanol; 7,5 % Essigsäure; A. dem.; 100 ml/Gel). Das Prozedere wurde bei klarem oder schwach blauem Gelhintergrund durch Lagerung der Gele in A. bidest. über Nacht beendet. Nach erneutem Abspülen mit A. bidest. konnten die Gele direkt verarbeitet oder bis zu ihrem weiteren Gebrauch in Folien eingeschweißt kühl gelagert werden.

Gefärbte Spots für die Peptidsequenzierung wurden unter der üblichen Vermeidung von Verunreinigungen (Handschuhe) mit dem Skalpell in engen Grenzen aus mehreren Gelen herausgeschnitten. Die jeweils einem Spot zugehörigen, etwa 1 mm<sup>3</sup> großen Stücke wurden in eigens für sie beschriftete 0,5 ml Eppendorf-Gefäße (siliconized) überführt. Der erste Schritt der Probenvorbereitung, bestehend aus dem Hinzufügen von 100 µl 25 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (pH 8,0) mit 50 % des organischen Lösungsmittels Acetonitril (ACn; Auffüllen aller Ansätze mit A. bidest.), 10-minütigem Vortexen und anschließender Entfernung der Lösung via Pipette (Gel-Loader Tips; eppendorf, Hamburg, Deutschland), diente dem Waschen und Dehydrieren in alkalischem Milieu. Die Prozedur wurde bis zur völligen Entfärbung und Schrumpfung der Gelstücke, mindestens jedoch dreifach wiederholt und durch Waschen in 100 µl reinem ACn sowie 30-minütiger SpeedVac-Zentrifugation (BACHOFER SpeedVac Concentrator, Reutlingen, Deutschland) abgeschlossen.

Im nächsten Schritt wurden die Stücke in Ammoniumcarbonat-Puffer (s. o.) mit Trypsin-Zusatz (0,1 mg/ml Lösung) aufgenommen. Bei Zugabe dieser der Rehydratation und dem Verdau (Spaltung hauptsächlich an den Carboxytermini der aromatischen Aminosäuren Arg und Lysin mit Ausnahmen bei folgendem Prolin) dienenden Lösung war Überstandbildung wegen drohender Autodigestion zu vermeiden. Eine 12-16-stündige Inkubation bei 37 °C mit einer vor Antrocknung schützenden Überschicht aus etwa 25 µl reinem Ammoniumcarbonat-Puffer (s. o.) stellte das optimale Enzymmilieu sicher.

Für die Extraktion der entstandenen Peptide aus der Gelmatrix wurden die Stücke bei anschließender Gewinnung des Überstandes in 50 µl A. bidest. für 5 min gevortext und dann weitere 10 min einem Ultraschallbad (Branson 220, Cleaning Technology Compagny, Trenton, NJ USA) unterzogen. Es folgte die zweimalige Wiederholung dieses Vorgehens mit 5 % Ameisensäure und 50 % ACn (selbes Volumen), eine ebenfalls 15-minütige Behandlung in 50 µl reinem ACn und das abschließende Einengen der Proben bis zur Trockenheit per SpeedVac (s. o.).

Der letzte Schritt bestand gemäß Tab. 2.5 aus dem für die massenspektrometrische Analyse wichtigen Entsalzen der dafür in 10 µl A. bidest. mit 4 % Methanol und 1 % Ameisensäure aufgenommenen Proben mittels C<sub>18</sub>ZipTips (Millipore Company, Bedford, MA USA).

Teilschritte	Durchführung <sup>1</sup>
1) Waschen der C <sub>18</sub> ZipTips	100 % Methanol (2x); 60 % Methanol mit 1 % Ameisensäure (3x)
2) Äquilibrierung der C <sub>18</sub> ZipTips	4 % Methanol mit 1 % Ameisensäure (3x)
3) Zugabe der Probenlösung	mehrfaches Auf- und Abziehen
4) Aufreinigen/Entsalzen	4 % Methanol mit 1 % Ameisensäure (3x)
5) Elution	60 % Methanol mit 1 % Ameisensäure

**Tab. 2.5 Entsalzung der Probenlösung.** 1) Auffüllen aller Ansätze mit Aqua bidest.; Einstellung der Pipette auf 10 µl.

Die ZipTip-Spitzen enthalten ein „reversed-phase“-Material, das Peptide in wässrigen Medien durch Van-der-Waals-Kräfte bindet und im Anschluss daran deren Elution in einem organischen Medium zulässt. Auf langsames und

luftblasenfreies Pipettieren sowie durchgehende Befeuchtung des „reversed-phase“-Materialies war zu achten.

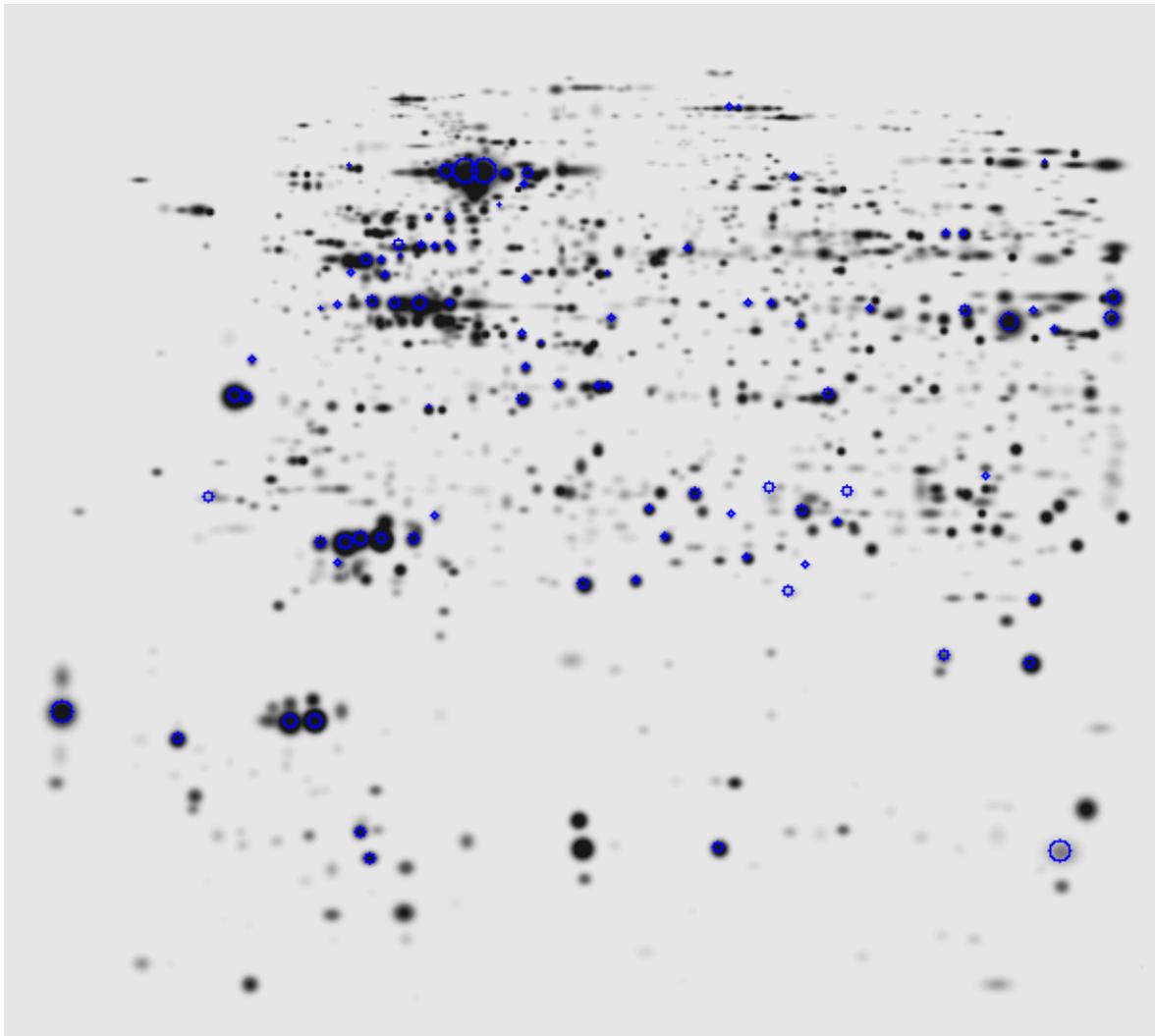
Der Probenvorbereitung folgte schließlich die Analyse des Eluates in einem Tandemmassenspektrometer mit Nanospray-Ionenquelle (Sciex Q-Star Pulsar I, PE Applied Biosystems, Foster City, CA USA). Jeweils 1,5 µl Lösung wurden in die ESI-Probenkapillare injiziert, was für eine etwa einstündige Messung ausreichte. Aus vorab aufgenommenen Übersichtsspektren im Massenbereich  $m/z = 350-1800$  ließen sich dann mittels Produkt-Ionenanalyse sukzessive detaillierte MS/MS-Spektren der interessierenden Mutterionen/Precursoren anfertigen (weitere vorgegebene Einstellungen: Scan type modus = TOF MS, Accumulation time = 1 s, Polarity = Positive, Period = 5min/300 cycles, Q1 transmission window und Pulser frequency = Suggest, Declustering potential = 65, Focussing potential = 265, Ion rel. del. = 11, Ion rel. width = 5, Grid = -6, Lens focus = 3, Lens screen = 1, Curtain gas = 15, Ion spray voltage = 850 V bei Messung, Detector = 2200 MCP, etc.)

Die Bestimmung mehrerer kurzer Aminosäureabfolgen (sequence tags) aus diesen Spektren reichte in der Mehrzahl der Fälle für die folgend beschriebene vergleichende Datenbankrecherche aus. Zur Funktionsweise des verwendeten Massenspektrometers sowie dem Prinzip der Peptidsequenzierung siehe Kap. 1.1.3 (Abb. 1.2) und 3.1.4.

### **2.1.7 Proteinidentifikation über Datenbanken**

Die Ermittlung weniger Peptidsequenzen führte mit Hilfe des „Mascot“-Suchwerkzeuges (<http://www.matrixscience.com> → Mascot → MS/MS Ion Search → Start Search...; von den Vorgaben abweichend einzustellende Parameter: Database = NCBIInr, Variable modifications = Carbamidomethyl [C], Peptide tol. = 1.0 Da, Data format = Sciex AP III, Overview = ESI-QUAD-TOF) (Abb. 1.2) oder im Falle einer De Novo-Sequenzierung durch Ähnlichkeitssuche in weiteren Spezies („Blast“-Algorithmus: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> → Protein → Search for short, nearly exact matches → Blast! → Format!; Übernahme aller Parameter) meist zur Identifikation der gesuchten Proteine (vgl. auch: Kap. 1.1.3).

Bei den Hundexperimenten geschah dies in einigen weiteren Fällen auch ohne zwischengeschaltete massenspektrometrische Analyse unzweideutig über die „HSC-2DPAGE“-Proteindatenbank (Heart Science Centre des Harefield Hospitals, Harefield, England) (42). Unter der Webadresse <http://www.doc.ic.ac.uk/vip/hsc-2dpage/dogvent/index.html> (→ Dog heart [ventricle] → Synthetic oder Real gel image) stellt diese u. a. 1212 Proteinspots enthaltende reale und nach Gaußscher Verteilung (untere Abb.) berechnete Polyacrylamidgele des Ventrikels von *Canis familiaris* für den optischen Vergleich zur Verfügung.



**Abb. 2.1** „Berechnetes“ silbergefärbtes 2D-PAGE-Gel des Hundeherzens (Ventrikel). Via Mausklick sind zu einigen Spots (Kreise) Zusatzinformationen wie  $M_r$  und IEP (Bestimmung mit PDQuest 2-D-Analysesoftware, Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire, England) aber auch aminoterminalen Sequenzen, PMF's sowie Links zu anderen Datenbanken (z. B. Swiss-Prot; Kap. 1.1.3) abrufbar.

## 2.2 Ergänzende morphologische Untersuchung

### 2.2.1 Gewinnung des Probenmaterials

Wie in Kap. 2.1.1 dargestellt wurden auch Beagle Nr. 8 (FH 10472) aus Tab. 2.1 nach entsprechendem Gewöhnungstraining Katheter in den linken Herzvorhof sowie die Aorta implantiert. Zwei Wochen nach Katheterimplantation folgte am wachen Tier zur späteren Bestimmung der Flussareale die diesmal alleinige Applikation radioaktiver Mikrosphären ( $^{46}\text{Sc}$ ). Vor dem sich anschließenden anderthalbstündigen finalen Eingriff durch einen anästhesiologischen Kollegen (Kap. 5.4) wurde das Tier endotracheal intubiert und dann über eine Starlingpumpe beatmet.

Zweck	Medikamente	i.v.-Dosierung
Narkose- einleitung	Propofol (Disoprivan <sup>®</sup> , AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland)	2 mg/kg KG
	Piritramid (Dipidor <sup>®</sup> , JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss, Deutschland)	4-7,5 mg (7,5 mg/ml)
Narkose- aufrecht- erhaltung	Midazolam (Dormicum <sup>®</sup> , Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)	2 mg·kg KG <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>
	Piritramid (siehe oben)	2 mg·kg KG <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>
Muskel- relaxation	Vecuronium (Norcuron <sup>®</sup> , Organon GmbH, Oberschleißheim, Deutschland)	0,12 mg·kg KG <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>

**Tab. 2.6 Narkoseführung während der abschließenden Operation.**

In Narkose (vgl. Tab. 2.6) erfolgte die linksseitige Thorakotomie und Freilegung des Perikards. Anders als bei den Hunden Nr. 1-7 wurde nun die Pars ascendens aortae okkludiert und proximal dieser Stelle kanüliert, um das Herz zunächst mit St. Thomas-Lösung Nr. 2 (98) kardiopleg zu stellen. Über denselben Zugang wurde im Anschluss daran das Koronarsystem bei einem Druck von 150 mmHg kurz mit Cacodylatspüllösung (0,1 M Cacodylat [pH 7,4] sowie 0,22 M Sucrose in A. bidest. zur Entfernung des Blutes) und dann für 5 min mit cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd (2,5 % Glutaraldehyd als Fixans mit guter [Lipid-]Strukturerhaltung in Cacodylatspüllösung [s. o.]) perfundiert.

Der Eingriff endete mit der Tötung des Tieres durch die Entnahme des Herzens und dessen Lagerung in letzt genannter Lösung für 72 h. Probenpräparation und Flussbestimmung erfolgten nach dem in Kap. 2.1.1 geschilderten Verfahren.

### 2.2.2 Elektronen- und Lichtmikroskopie

Die aufgearbeiteten Proben wurden im Rahmen der Nachfixierung und Blockkontrastierung dreifach mit Cacodylatpuffer (Cacodylatspüllösung [s. o.] ohne Sucrosezusatz) gewaschen und für 3 h bei 4 °C in Osmiumtetroxidlösung (2 % OsO<sub>4</sub> zur Lipidkontrastierung in Cacodylatpuffer) gegeben. Folgendes Protokoll vervollständigte diesen Arbeitsschritt: 70 %iges Aceton (Auffüllen aller Ansätze mit A. bidest.) zur Entwässerung für mind. 30 min → 70 %iges Aceton mit 1% Phosphorwolframsäure (hauptsächlich Proteinkontrastierung) sowie 0.5 % Uranylacetat (Protein- u. Nukleinsäurekontrastierung bei gutem Membranerhalt) für 1 h bei 4 °C → 90 %iges Aceton zweimalig für je 30 min bei 4 °C.

Zur Einbettung diente die niedrigvisköse Standard-Epoxidmischung nach Spurr (195) (10 g ERL-4206, 6 g D.E.R. 736, 26 g NSA, 0,4 g S<sub>1</sub>; 3-4 g Mischung pro Probe; Lagerung aller Komponenten außer S<sub>1</sub> [RT] im Kühlschrank; Mischung bei RT mehrere Tage stabil; Abkürzungen im Verzeichnis). Diese wurde sukzessive gemäß nachstehendem Schema in das Gewebe eingebracht: 100 %iges Aceton (Trockenhaltung auf Molekularsieb [3 Å, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland] im Rotor [Varispeed, TAAB Ltd., Aldermaston, England]) zweimalig für je 30 min → 100 %iges Aceton für 1h → 100 %iges Aceton und Mischung (1:1) für 1 h → Letzteres erneut im Verhältnis 1:2 → 100 % Mischung für 2 h, dann über Nacht → Endeinbettung mit 100 % Mischung für mind. 8 h bei 70 °C im Polymerisationsofen (Polaron CVT Ltd., Milton Keynes, England).

Von den für die EM-Auswertung bestimmten Proben wurden ultradünne Schnitte (0,05 µm) längs der Myofibrillen und somit auch der Mitochondrien mittels eines Diamantmessers (Diatome, Biel, Schweiz) angefertigt, auf Kupfernetzchen (Typ G 100, Plano, Marburg, Deutschland) gebracht und erneut mit Uranylacetat kontrastiert (s. o.). Die Aufnahme und Digitalisierung der Mitochondrien erfolgte bei 25.000facher Vergrößerung (Transmissions-Elektronenmikroskop Typ H 600, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan; BioScanCamera und Software Digital Micrograph 3.1, Gatan, Pleasanton, CA USA;).

Für die LM-Analyse der Kapillaren galt entsprechend: Semidünnschnitte (1 µm) quer zu Myofibrillen und somit Kapillaren (Glastreifen für Messer ebenfalls Plano, s. o.); Färbung mit 1 % Toluidinblau O und 1 % Natriumtetraborat in A. dest. auf Heizplatte für 1 min → Spülung mit A. dest. und Trocknung; Aufnahme und Digitalisierung mit 400facher Vergrößerung (Mikroskop BX 60 und BX PHD Phasenkontrasteinrichtung [Ph1], OLYMPUS, Hamburg, Deutschland; Power HAD 3CCD Kamera DXC-950P, SONY CORPORATION, Tokyo, Japan; Software analySIS 3.0, Soft Imaging System GmbH, Münster Deutschland).

### 2.2.3 Morphometrische Auswertung

In diese flossen aus n=6 NF- und n=6 HF-Proben 288 EM- sowie 288 LM-Photos mit jeweils 144 Aufnahmen von NF- und 144 Aufnahmen von HF-Arealen ein. Um die prozentualen Volumenanteile der Mitochondrien resp. Kapillaren am Herzgewebe von Hochfluss- und Niedrigflussarealen ermitteln zu können, wurden für sämtliche Aufnahmen einer Probe die jeweiligen prozentualen Flächenanteile mit einer Punktgittermethode bestimmt (168) und später gemittelt. Hierzu erfolgte nach ihrer Digitalisierung die Überlagerung der Bilder mit einem quadratischen Raster, dessen Gitterweite so festzulegen war, dass es die auszuwertenden Strukturen mit mindestens einem Gitterpunkt erfasste. Die Anzahl dieser Treffer T sowie die Gesamtzahl der Gitterpunkte des Rasters  $G_{\text{ges}}$  ergaben den gesuchten Flächenanteil wie folgt:

$$\text{Flächenanteil} = \frac{T}{G_{\text{ges}}} \cdot 100\% \quad (\text{F 2.2})$$

Die mit dem Raster versehenen Aufnahmen wurden größtmöglich auf DIN A4-Blätter ausgedruckt und manuell ausgezählt. Das Gitter zur Erfassung der Mitochondrienanteile (Abb. 3.11) bestand einschließlich des Randes aus  $31 \times 31$  Gitterlinien und wies somit insgesamt 961 Gitterpunkte auf (Kapillargitter:  $36 \times 36 = 1296$  Gitterpunkte; Abb. 3.12). Gitterpunkte, die über Artefakten (Risse, etc.) zu liegen kamen, wurden nicht als Treffer gewertet, jedoch von  $G_{\text{ges}}$

subtrahiert. Eindeutig als solche klassifizierbare Arteriolen bzw. Venolen fanden keine, die kapillaren Gefäßwände hingegen gesonderte Berücksichtigung. Da sämtliche Proben im Vorfeld der Auszählung von dritter Hand umkodiert wurden, erfolgte diese bezüglich der Kenntnis der Flusszugehörigkeit blind.

## 2.3 Varia

### 2.3.1 Statistik

Die Daten werden grundsätzlich als Mittelwert  $\bar{x} \pm$  Standardabweichung  $\sigma$  angegeben. Folgende Prozentwerte, sind dies die Änderungen NF (WT) zu HF (Myo<sup>-/-</sup>) und vice versa. Alle Auswertungen erfolgten unter Beachtung der jeweiligen Stichprobenkonstellation mit zweiseitigen verbundenen oder unverbundenen Student-t-Tests (wenn nicht anders bezeichnet: \* = signifikant,  $P < 0,05$ ; \*\* = sehr signifikant,  $P < 0,01$ ; \*\*\* = hoch signifikant,  $P < 0,001$ ).

Um dem methodisch bedingten Variationskoeffizienten bei wiederholtem Messen (Kap. 3.1.1), einer ausreichenden biologischen Relevanz und schließlich der Irrtumswahrscheinlichkeit im Rahmen des multiplen Testens (FWER) Rechnung zu tragen, mussten die Proteinexpressionsunterschiede im Falle der Hunde-Proteomanalyse (je n=30 zweifach bestimmte NF- bzw. HF-Proben [n=5 NF- und n=5 HF-Areale aus je n=6 Hundeherzen]) folgende Kriterien erfüllen, um Berücksichtigung zu finden:

- 1) Weder zu geringe oder hohe Spotintensität ( $< 0,02$  % des totalen Spotvolumens versus Farbsättigung mit Kristalleffekten [meist ab etwa 2 %]) im NF und HF noch mangelnde Reproduzierbarkeit durch Cluster- oder Schlierenbildung, etc. (eindeutige Präsenz in  $> 83$  % der NF- bzw. HF-Gele);
- 2) Änderung  $> 30$  % beim Vergleich NF zu HF oder umgekehrt;
- 3)  $P < 0,05$  im t-Test für unverbundene Stichproben (je n=30);
- 4)  $P < 0,05$  im t-Test für verbundene Stichproben (n=6 NF- und n=6 HF-Mittelwerte aller entsprechenden Areale innerhalb der individuellen Herzen) zur Erfassung auch geringer Abhängigkeiten zwischen NF- und HF-Gebieten jeweils eines Herzens;

Die ersten beiden Kriterien galten vergleichbar auch bei der später durchgeführten murinen Proteomanalyse (n=12 Myo<sup>-/-</sup> und n=12 WT-Proben; Zweifachbestimmung). Neben einem unverbundenen t-Test zum Vergleich

erfolgte die statistische Auswertung hierbei mit dem Statistikprogramm „Significance Analysis of Microarrays, SAM“ (203) (<http://www-stat-class.stanford.edu/SAMServlet>). Für zu vergleichende

Datensätze A und B bildet es zunächst „Relative Differenzen“  $d(i) = \frac{\bar{x}_A(i) - \bar{x}_B(i)}{\sigma(i) + s_0}$ .

Dies sind Differenzen von Expressionsmittelwerten (hier der Proteine [i]) bezogen auf die jeweilige Standardabweichung

$$\sigma(i) = \sqrt{\frac{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}{n_1 + n_2 - 2} \left( \sum_m [x_m(i) - \bar{x}_A(i)]^2 + \sum_n [x_n(i) - \bar{x}_B(i)]^2 \right)}$$

(mit m und n = Nummer

einer Messung unter Kondition A bzw. B sowie  $n_1$  und  $n_2$  = Gesamtanzahl der Messungen im Falle A resp. B) und einen zuvor berechneten „Fudge Factor“ ( $s_0$ ) zur Korrektur unverhältnismäßig geringer  $\sigma(i)$ -Beträge bei niedrigem Expressionsniveau. Die Besonderheit ist das mehrfache Durchführen des Beschriebenen nach Gruppieren der Rohdaten in verschiedenen Varianten (Permutationen), wobei letztere bezüglich potentieller Störgrößen balanciert sind.

Das ermöglicht die Bildung „Erwarteter Relativer Differenzen“  $d_E(i) = \frac{1}{G_p} \sum_p d_p(i)$

(mit  $p$  = Nummer einer Permutation sowie  $G_p$  = Gesamtanzahl der Permutationen), welche diejenigen beobachteten  $d(i)$ -Werte im Sinne der Fragestellung als signifikant markieren, welche im Plot  $d_E(i)$  (Abszisse) versus  $d(i)$  (Ordinate) über einen festzulegenden „Delta Value“ ( $\Delta$ ) hinaus von der Identitätlinie abweichen (Abb. 3.8). Mit der Funktion „List Significant Genes“ lassen sich die Resultate in Form zweier Listen für positive und negative Veränderung mit nach ihrem Betrage sortierten  $d(i)$ -Werten ausgegeben. Bei Bedarf können beide Listen mit individuellen  $\Delta$ 's generiert werden.

Parallel dazu schätzt das Programm ähnlich einer Irrtumswahrscheinlichkeit die „Number Of Falsely Significant Proteins (Genes)“ über den Mittelwert der als signifikant bezeichneten Proteine (Gene) aller Permutationen. Mit der Funktion „List Delta Table“ lassen sich hierbei verschiedene Szenarien für unterschiedliche  $\Delta$ 's durchrechnen.

Bei dieser Untersuchung wurde  $\Delta$  so gewählt, dass die „Number Of Falsely Significant Proteins“ bei  $< 1$  (90. Perzentil) lag, was im vergleichenden unverbundenen t-Test einem  $P \ll 0,05$  entsprach. Zusätzlich einzustellende Parameter lauteten: Imputation Engine = Row Average Imputer, Data Type = Two Class/Unpaired Data, Number of Permutations = 100, RNG Seed = 1234567, Threshold = 0,0.

Weiterführende Informationen (ausführliches mathematisches Prozedere, Berechnung des „Fudge Factors“, Bedeutung der einzustellenden Parameter, Anpassung von SAM an unterschiedliche Experimentbedingungen, Vergleich von SAM mit herkömmlichen Statistikmethoden des multiplen Testens, Download aus dem Internet, etc.) sind den oben angegebenen Quellen zu entnehmen.

### **2.3.2 Chemikalien/Reagenzien**

Siehe Anhang (Kap. 5.3).

## **3 Ergebnisse**

In diesem Kapitel werden zunächst die Optimierung und parallel darstellbare, allgemeine Kenndaten beider Proteomanalysen wiedergegeben. Es folgt jeweils ein spezieller Abschnitt zu den Ergebnissen der Hundestudie einschließlich der morphologischen Auswertung resp. zu den Ergebnissen der Mäusestudie. Relevante Ergebnisse der parallel zu dieser Arbeit durchgeführten, weiterführenden Experimente und von Folgeuntersuchungen sind im Diskussionsteil skizziert (Blutflussheterogenität: Kap. 4.1.1 und 4.1.6; Myoglobindefizienz: Kap. 4.2.1 und 4.2.5)

### **3.1 Optimierung und allgemeine Auswertung beider Proteomanalysen**

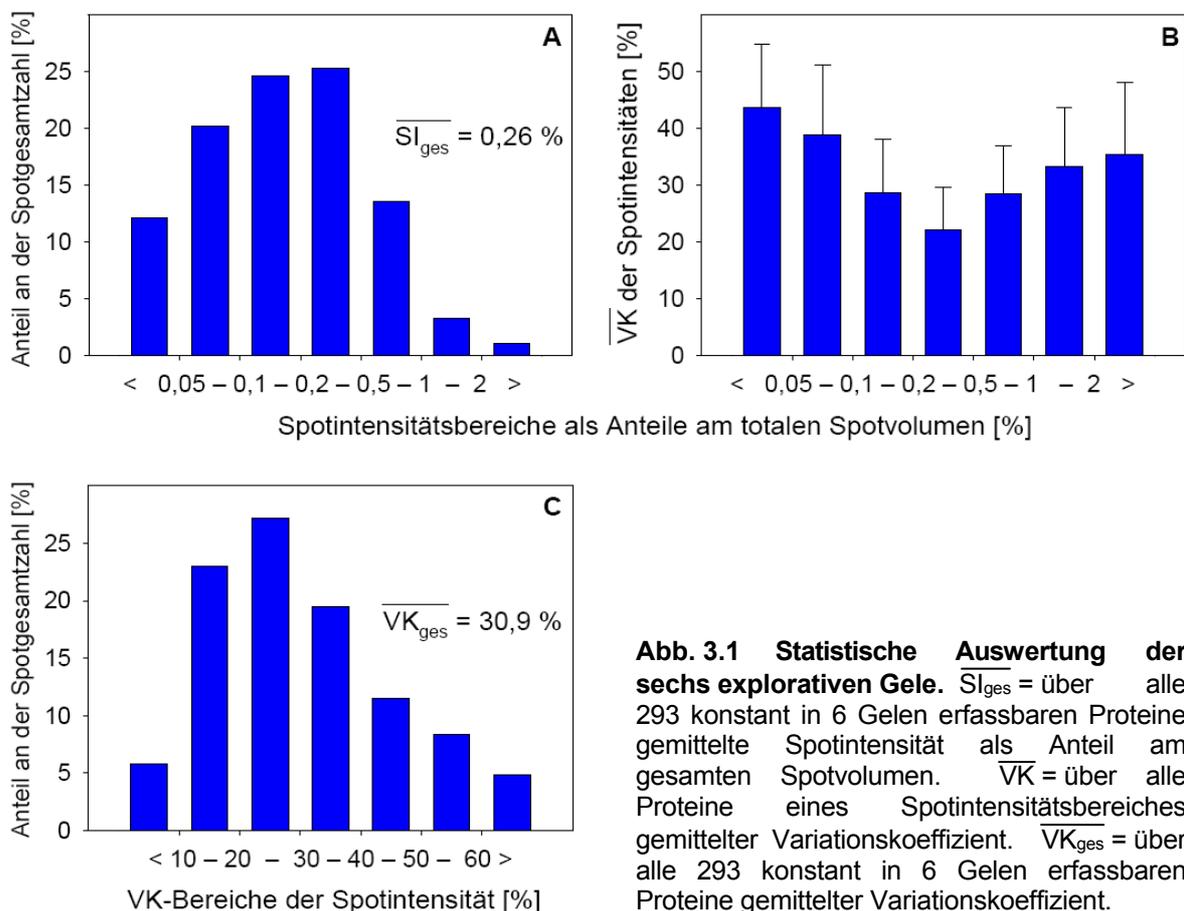
#### **3.1.1 Optimierung und Evaluation der 2D-PAGE**

Hierzu wurden nach Abstimmung einzelner Arbeitsschritte in explorativen Experimenten (Kap. 2.1.5) u. a. sechs silbergefärbte, 13 %ige Polyacrylamidgele (1 mm × 17 cm × 16 cm) von nur einer Hundeherzprobe hergestellt. Die Gele enthielten durchschnittlich  $394 \pm 22$  zuverlässig erfassbare Spots, von denen 293 konstant in allen sechs Fällen auffindbar waren und statistisch ausgewertet wurden.

Als Indikator einer hohen methodischen Reliabilität im Sinne geringfügiger Messwertschwankungen galt bei der wiederholten Analyse einer identischen Probe ein möglichst kleiner über alle Proteine gemittelter Variationskoeffizient der sechsfachen Spotintensitätsbestimmung. Unabhängig von der praktischen Durchführung der Probeexperimente beeinflusste auch die Art der Hintergrundsubtraktion (Kap. 2.1.5) im Rahmen der Auswertung am Computer (Programm: ImageMaster 2D Elite 3.01, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) diesen Variationskoeffizienten. Der mit 30,9 % niedrigste gemittelte Betrag (Abb. 3.1 C) ergab sich bei der im weiteren Verlaufe ausschließlich verwendeten Option „Mode of Nonspot“ im Vergleich zu „Average on Boundary“ (34,8 %) und „Lowest on Boundary“ (33,8 %). „Mode of Nonspot“ berechnet dabei den zu subtrahierenden Hintergrund durch Grauwertmittelung innerhalb größer definierter Spotumgebungsareale als die beiden Alternativen.

Die simultan hergestellte Gele 1 + 2, 3 + 4 sowie 5 + 6 wiesen bei den Voruntersuchungen einen durchschnittlich um weitere 2,0 %, geringeren Variationskoeffizienten auf, was die Bedeutung der später verwendeten größeren Elektrophoreseeinheit unterstreicht, die für 12 statt nur für 4 Gele ausgelegt ist.

Abb. 3.1 fasst die statistischen Auswertungen zu den 293 konstant in allen 6 Gelen erfassbar gewesenen Spots mittels dreier Diagramme zusammen. Diagramm A gibt zunächst die Häufigkeitsverteilung der Spotintensitäten wieder. Proteine mit einer mittleren Intensität im Bereich von 0,2 % bis 0,5 % des totalen Spotvolumens ( $\hat{=}$  Summe aller 293 Spotvolumina; Definition des Spotvolumens: Kap. 2.1.5) waren demnach am häufigsten vertreten (25,3 % der Spotgesamtzahl von 293). Die genaue über alle 293 Proteine gemittelte Spotintensität betrug dabei 0,26 % des totalen Spotvolumens. Aus Diagramm B wird ersichtlich, dass eben diese Gruppe von Proteinen auch am reliabelsten zu erfassen war, was sich durch den mit 21,1 % niedrigsten gemittelten Variationskoeffizienten innerhalb eines Intensitätsbereiches ausdrückt. Diagramm C schließlich zeigt die daraus resultierende Häufigkeitsverteilung des Variationskoeffizienten für alle 293 Proteine. Spots, bei denen sich im Rahmen der Sechsfachbestimmung



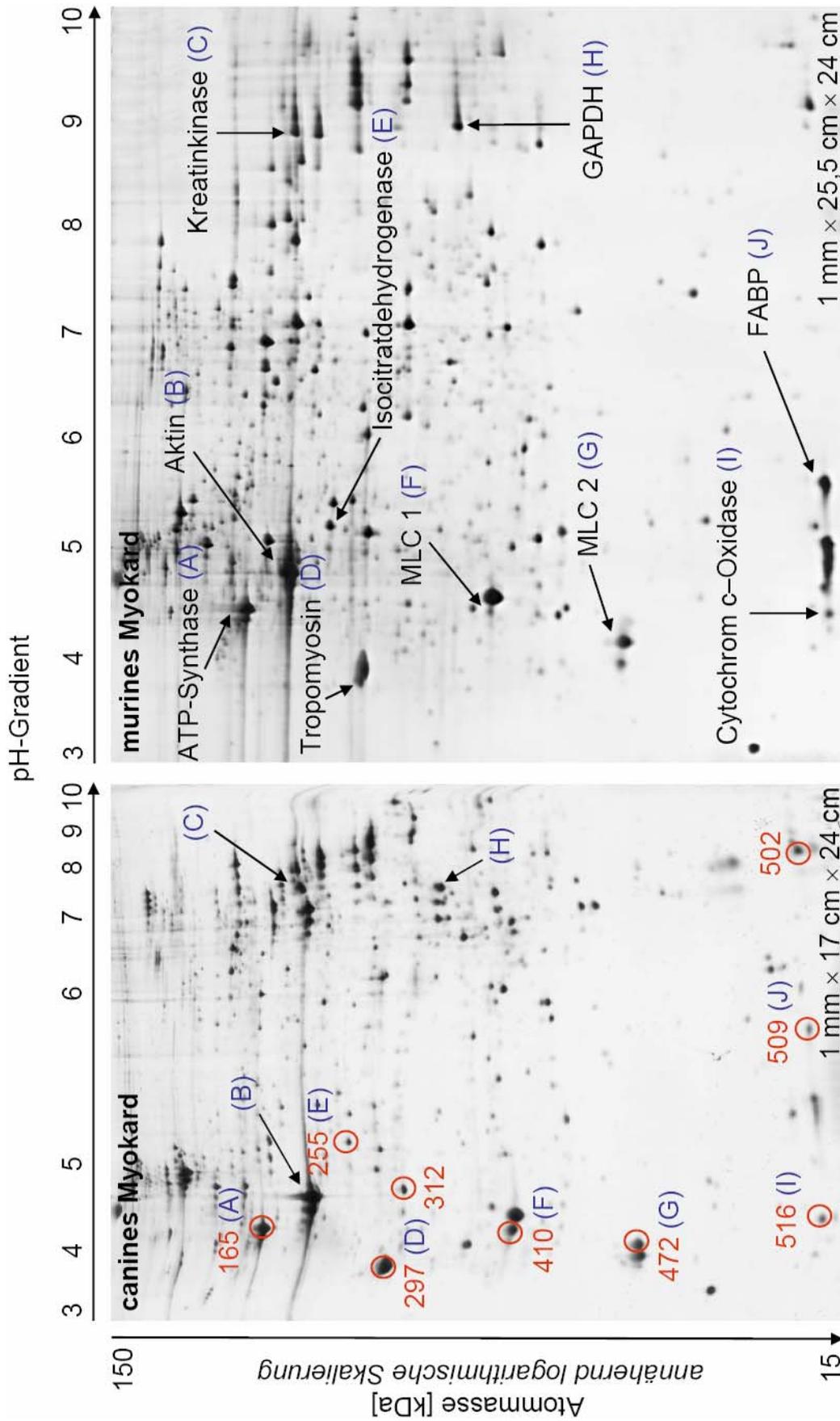
**Abb. 3.1 Statistische Auswertung der sechs explorativen Gele.**  $\overline{SI}_{ges}$  = über alle 293 konstant in 6 Gelen erfassbaren Proteine gemittelte Spotintensität als Anteil am gesamten Spotvolumen.  $\overline{VK}$  = über alle Proteine eines Spotintensitätsbereiches gemittelter Variationskoeffizient.  $\overline{VK}_{ges}$  = über alle 293 konstant in 6 Gelen erfassbaren Proteine gemittelter Variationskoeffizient.

Variationskoeffizienten zwischen 20 % und 30 % ergaben, machen hiernach mit 27,2 % an der Spotgesamtzahl von 293 die größte Untergruppe aus. Der oben bereits erwähnte mittlere Variationskoeffizient aller 293 Proteine betrug dabei 30,9 %. Die statistischen Ergebnisse waren Grundlage für die Bewertung der Methodik in Bezug auf deren Leistungsfähigkeit bei der Detektion wahrer Proteinexpressionsunterschiede. Diese sollten demzufolge bei einem experimentellen Vergleich mindestens 30 % betragen, um von reinen Messwertschwankungen besser abgrenzbar zu sein. Auch die Spotintensitätsgrenzen innerhalb derer eine reliable Erfassung der Proteine noch möglich ist, konnten durch die Voruntersuchungen abgeschätzt werden. Beide Aspekte wurden zu wesentlichen Kriterien der späteren Auswertung (Kap. 2.3.1).

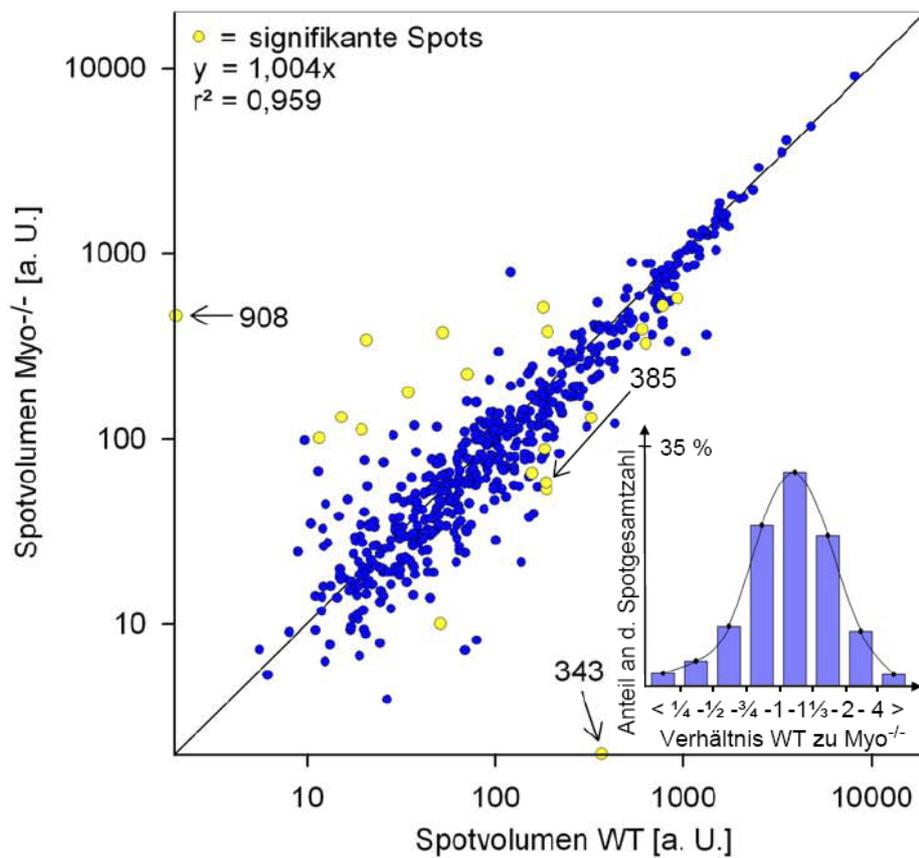
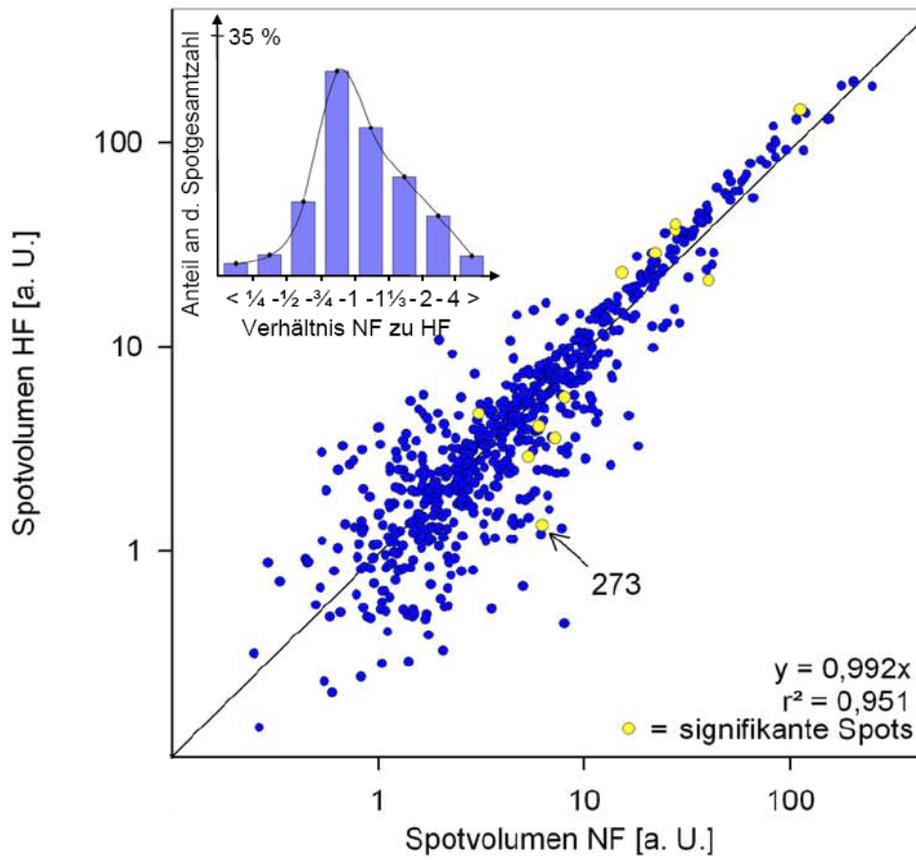
#### **3.1.2 Anzahl und Verteilung erfasster Proteinspots**

Unterschiede in der lokalen myokardialen Proteinexpression von NF- und HF-Arealen (lokaler Blutfluss < 50 % gegenüber > 150 % des myokardialen Mittelflusses) bei Hunden (je n=30 zweifach bestimmte NF- bzw. HF-Proben [n=5 NF- und n=5 HF-Areale aus n=6 Hundeherzen]) bzw. WT- und Myo<sup>-/-</sup>-Mäusen (je n=12 Herzen; Zweifachmessung) wurden mittels 2D-PAGE analysiert. Abb. 3.2 stellt repräsentative Gele aus beiden Experimenten vor und demonstriert Unterschiede der Maße sowie pH-Gradienten.

Auf den Hundegelen waren im Durchschnitt  $380 \pm 79$  (NF:  $389 \pm 82$ , HF:  $370 \pm 75$ , je n=60 Gele) Spots zuverlässig detektierbar, bei den Mäusen betrug diese Anzahl  $461 \pm 22$  (WT:  $466 \pm 18$ , Myo<sup>-/-</sup>:  $455 \pm 26$ , je n=24 Gele). Eine ausführlichere Beschreibung der computergestützten Spoterfassung findet sich in Kap. 2.1.5. Abb. 3.3 und Abb. 3.4 verdeutlichen die über alle Gele gemittelte (Häufigkeits-)Verteilung der Proteinexpressionsunterschiede bezüglich beider Alternativen der jeweiligen Fragestellung. Dabei sind die durch Punkte symbolisierten Proteine so entlang der Abszisse resp. Ordinate angeordnet, dass sie bei steigenden Expressionsänderungen immer weiter fernab einer diagonal verlaufenden Identitätslinie zu liegen kommen. Die den Insets zu entnehmende Häufigkeitsverteilung der Expressionsänderungen ist mittels einer 25 %-Gruppierung in beide möglichen Änderungsrichtungen dargestellt. Proteine mit geringen Expressionsänderungen bilden hier demnach die mittleren Säulen nahe dem Abszissenwert 1.



**Abb. 3.2 Repräsentative silbergefärbte 2D-PAGE-Gele vom Hunde- (links) und Mäuseherzen (rechts).** Wesentlichster Unterschied neben den Maßen sind die pH-Gradienten der ersten Dimension der ersten Dimension mit einer Dehnung des pH-Wertbereiches von 5 bis etwa 7 im Falle des Hundegels. In diesem sind auch bereits Markerproteine mit annähernd gleichem Expressionsniveau in NF- und HF-Arealen eingekreist (Näheres Tab. 3.1). Die Buchstaben in Klammern markieren exemplarisch einige äquivalente Untereinheiten von im Mäusegel genauer bezeichneten Proteinen. Abkürzungen im Verzeichnis.



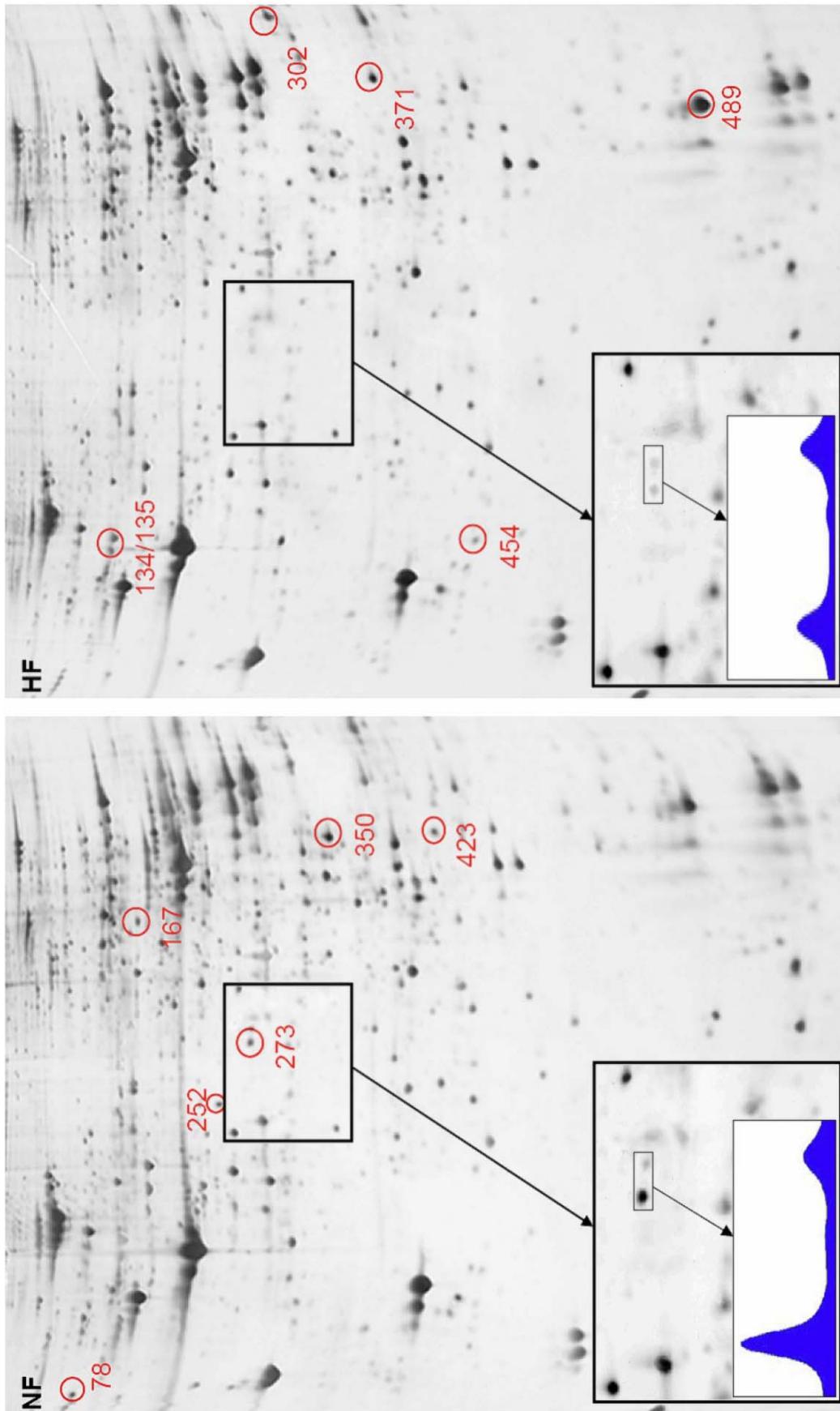
**Abb. 3.3 und 3.4** Gemittelte (Häufigkeits-)Verteilung der Proteinexpressionsunterschiede aus allen 2D-PAGE-Gelen von Hunde- (oben) resp. Mäuseherzen (unten). Jedes Diagramm berücksichtigt sämtliche Proteine aus den jeweiligen Referenzgelen (Hunde: 770, je n=60 Gele; Mäuse: 599, je n=24 Gele; Kap. 2.1.5). Die meisten Spots weisen lediglich geringe Intensitätsänderungen auf, die Bestimmtheitsmaße ( $r^2$ ) sind jeweils  $> 0,95$  und die Trendliniensteigungen ( $\rightarrow$  Geradengleichungen) liegen nahe 1. Signifikante Proteine sind bereits gelb hervorgehoben und liegen im Vergleich nicht zwangsläufig weiter fernab der Trendlinie. Die Abszissen der eingefügten Säulendiagramme geben Änderungen der jeweiligen Expressionsverhältnisse in beide Richtungen mit einer 25 %-Gruppierung wieder (Ordinaten: Häufigkeiten als Anteile an der Referenzspotgesamtzahl). *Oben:* Spot Nr. 273 wies die mit Abstand höchste Signifikanz in beiden t-Tests auf (vgl. Abb. 3.7). *Unten:* Hier war Protein Nr. 385 sowohl im unverbundenen t-Test als auch in der Bewertung durch das Statistikprogramm SAM (Kap. 2.3.1) am signifikantesten (vgl. Abb. 3.8). Die Spots Nr. 343 und 908 kodieren die beiden Varianten eines identischen Proteins (Tab. 3.3).

### 3.1.3 Ermittlung signifikanter Proteinspots

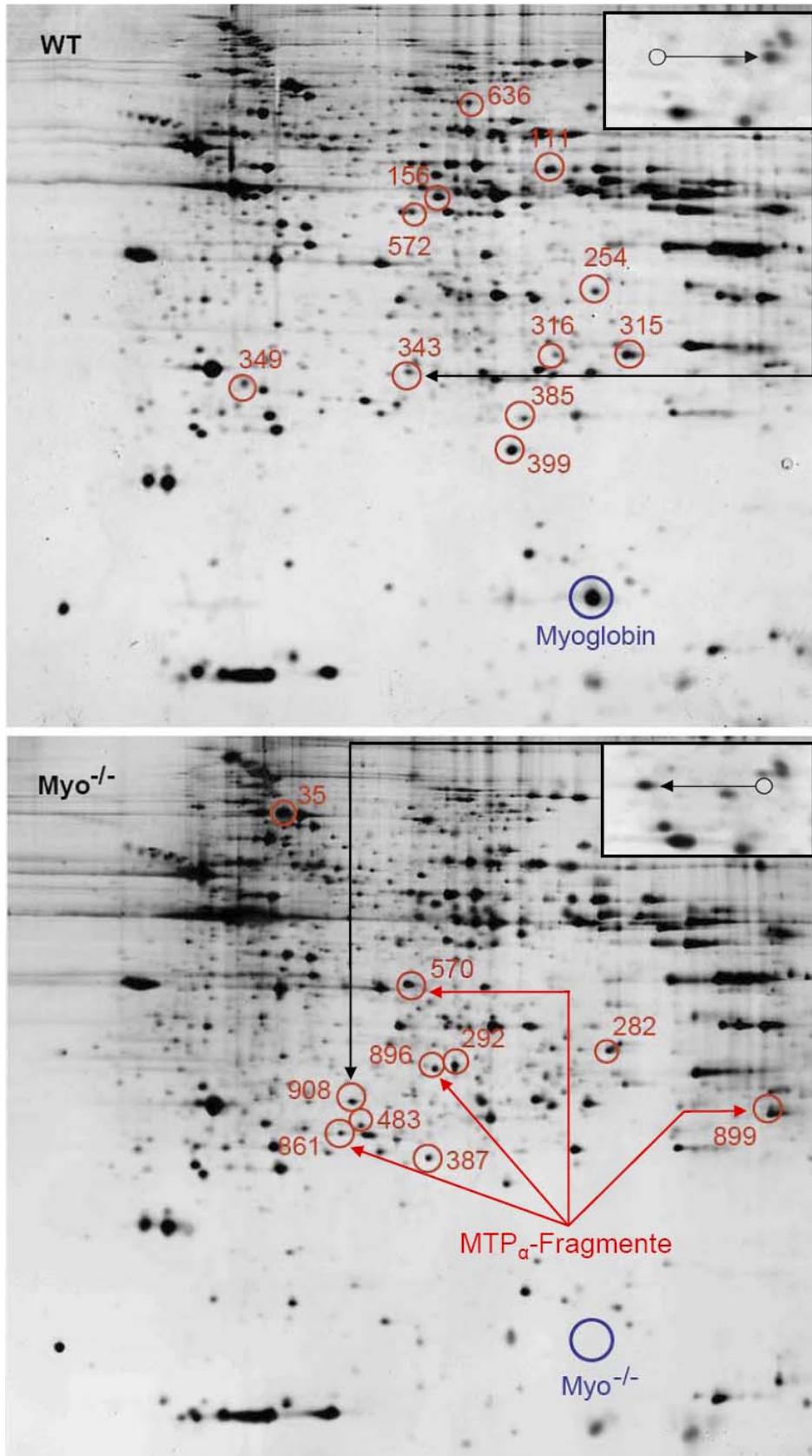
Wie aus Abb. 3.3 bzw. 3.4 ersichtlich, weist das Gros der Proteinspots ähnliche Spotvolumina auf. Zunächst wurden solche mit besonders geringen Veränderungen für eine spätere Identifikation von Markerproteinen (Kap. 3.2.1) ermittelt.

61 von 770 Spots des Hundereferenzgels zeigten im Vergleich aller 30 NF- und 30 HF-Proben aus den 6 Herzen Unterschiede mit einem  $P < 0,05$ . Bildete man zunächst für jedes Herz die über 5 NF- resp. HF-Proben gemittelten Spotvolumina der untersuchten Proteine und verglich dann die so entstandenen 6 Wertpaare, lag die Anzahl der Signifikanzen bei 63. Lediglich 30 Spots waren im Sinne einer Schnittmenge bei beiden Vorgehensweisen auffällig. Nach Anwendung auch der anderen in Kap. 2.3.1 postulierten Kriterien (Expressionsänderungen  $> 30\%$  beim Vergleich NF zu HF oder umgekehrt, Einhalten der Spotintensitätsgrenzen, etc.) blieben 12 Proteinspots übrig, von denen 6 in den NF- und weitere 6 in HF-Regionen eine höhere Expression zeigten. Abb. 3.5 zeigt ein repräsentatives Gel, in dem die signifikant veränderten Proteinspots durch Umkreisung hervorgehoben sind. Für den die größte Signifikanz aufweisenden Spot 273 geben Insets zusätzlich ein Intensitätsprofil wieder.

Nach Auswertung der Mäusegele mit dem Statistikprogramm SAM (alle Auswertekriterien und Vergleichbarkeit mit der herkömmlichen t-Test-Methode siehe Kap. 2.3.1) wurden hier 21 von 599 der Referenzspots als signifikant verändert ermittelt, wobei 11 in den WT- und 10 in den Myo<sup>-/-</sup>-Gelen höhere Volumina aufwiesen. Abb. 3.6 zeigt wiederum ein repräsentatives Gel mit umkreisten signifikant veränderten Proteinspots. Das Myoglobin und die einem größeren Protein zugehörigen Untereinheitfragmente sind zusätzlich beschriftet. Insets verdeutlichen im Falle eines der Proteine die durch eine vermeintliche Spleißvariante hervorgerufene Verschiebung des isoelektrischen Punktes.

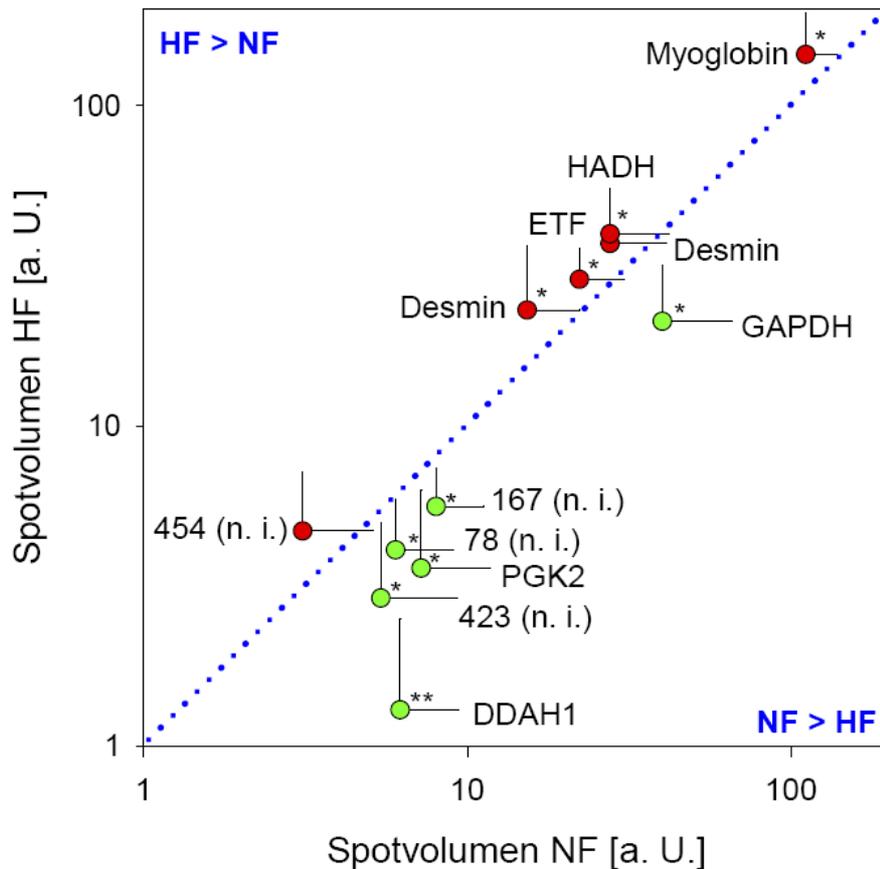


**Abb. 3.5 Repräsentative silbergefärbte 2D-PAGE-Gele von NF- und HF-Arealen des caninen Myokards.** Proteine mit im Vergleich signifikant höherer Expression sind in den entsprechenden Gelen umkreist. Die Insets zeigen den in Niedrigflussarealen deutlich betonten Spot Nr. 273 vergrößert. Dessen unterschiedliche Ausprägung verdeutlicht zusätzlich ein über die unmittelbare Umgebung (kleinstes Rechteck) gemitteltes zweidimensionales Intensitätsprofil. Das in beiden t-Tests auch die höchste Signifikanz aufweisende Protein wurde als N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-Dimethyl-L-Arginin-Dimethylaminohydrolase 1 identifiziert (Näheres Tab. 3.1).



**Abb. 3.6** Repräsentative silbergefärbte 2D-PAGE-Gele von WT- und *Myo*<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen. Proteine mit im Vergleich signifikant höherer Expression sind in den entsprechenden Gelen umkreist, das Myoglobin und die  $\alpha$ -Untereinheitfragmente des Mitochondrialen Trifunktionalen Proteins (Näheres: Tab. 3.3) zusätzlich beschriftet. Beide Insets zeigen die durch eine vermeintliche Spleißvariante (Folge: 123A  $\rightarrow$  123D) (145) hervorgerufene Verschiebung des isoelektrischen Punktes der Non-Selenium Glutathion-Peroxidase vergrößert (Näheres: Tab. 3.3).

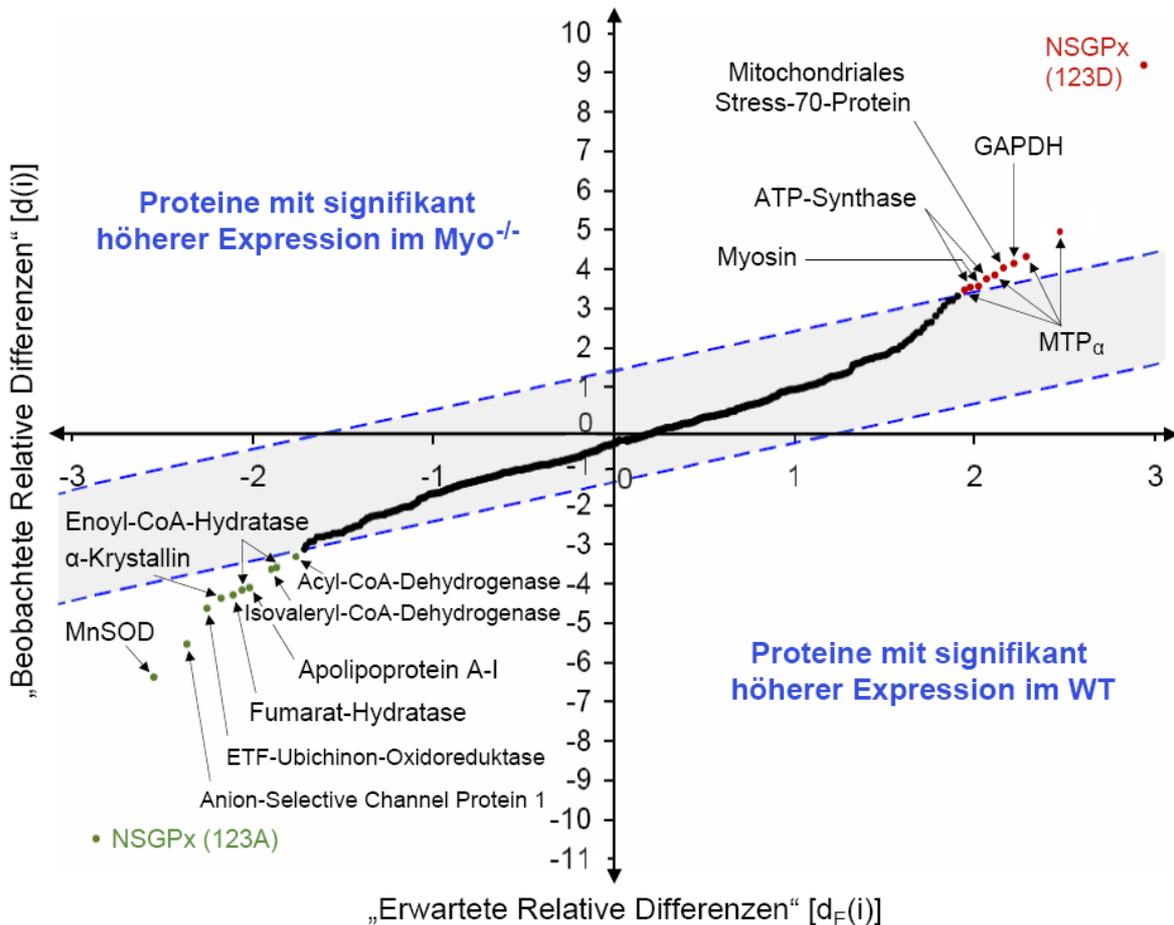
Abb. 3.7 gibt das Ergebnis der statistischen Auswertung im Hundexperiment graphisch wieder. Die durch 12 Punkte symbolisierten signifikant veränderten Proteine sind erneut so entlang der Abszisse resp. Ordinate angeordnet, dass sie bei steigenden Expressionsänderungen immer weiter fernab der blau gestrichelten Identitätslinie zu liegen kommen. Für eine genauere Darstellung der quantitativen Intensitätsunterschiede siehe Abb. 3.10 im speziellen Ergebnisteil Hunde.



**Abb. 3.7** Signifikant veränderte Proteine beim Vergleich NF/HF (Hunde). Die Identifikation der 12 Spots ist bereits vorweggenommen (n. i. = nicht identifizierbar; Näheres: Kap. 3.2.1). Die Striche geben Standardabweichungen für NF- und HF-Spotvolumina wieder. Nicht mit einem Stern (\*) versehene Proteine sind hier bereits mit  $P < 0,05$  signifikant (\* = sehr signifikant,  $P < 0,01$ ; \*\* = hoch signifikant,  $P < 0,001$ ). Alle Angaben zur Signifikanz gelten sowohl für den unverbundenen als auch für den verbundenen t-Test (je  $n=60$  Gele).

Abb. 3.8 verdeutlicht abschließend das Ergebnis der statistischen Auswertung im Mäusexperiment. Dargestellt ist eine überarbeitete Graphik des Statistikprogrammes SAM. Hier gelten letztlich solche Proteine als signifikant, welche im durch die Software erzeugten Plot  $d_E(i)$  („Erwartete Relative Differenzen“, Abszisse) versus  $d(i)$  („Beobachtete Relative Differenzen“, Ordinate) über einen festzulegenden „Delta Value“ ( $\Delta$ , blau gestrichelte Linien) hinaus von der Identitätslinie (nicht eingezeichnet) abweichen. Bei dieser Untersuchung wurde  $\Delta$  so gewählt, dass die als signifikant bezeichneten Proteine in einem zusätzlich

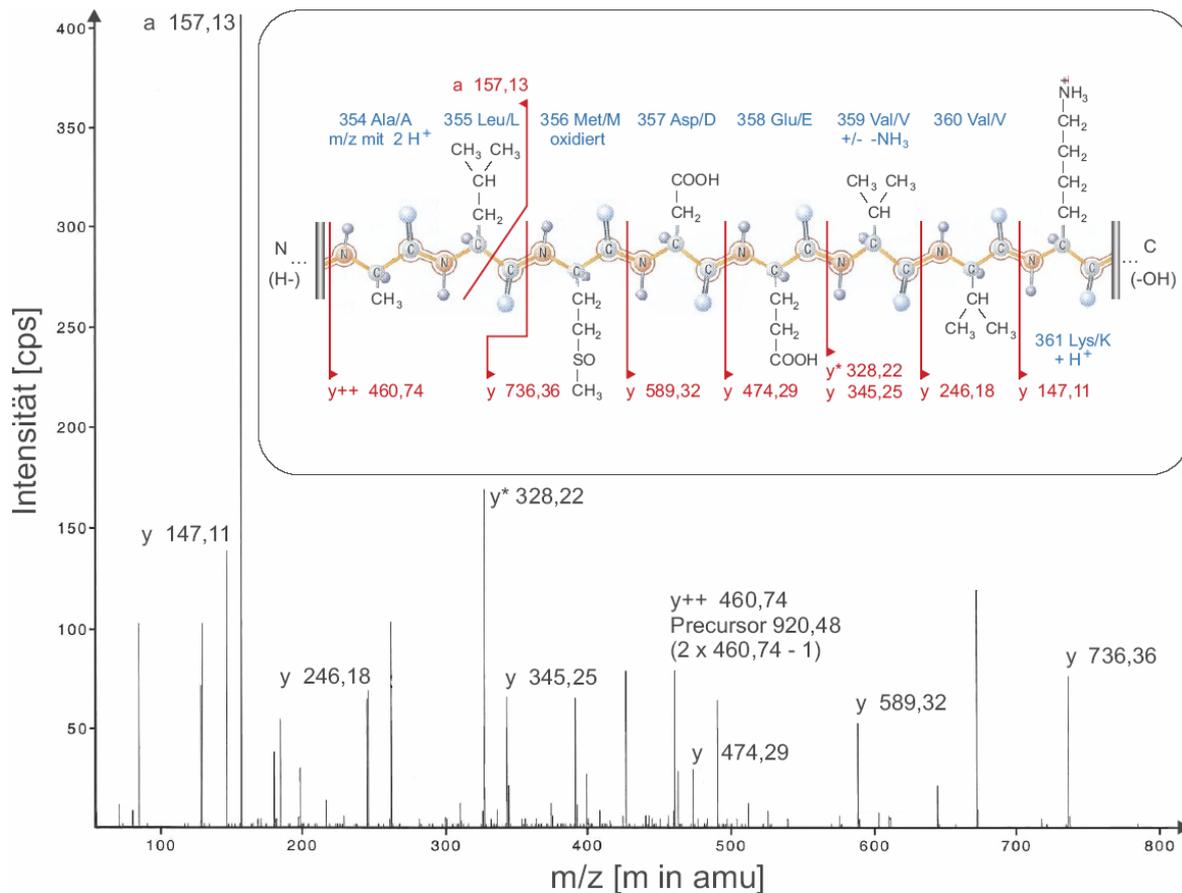
durchgeführten unverbundenen t-Test einen P-Wert von deutlich  $< 0,05$  erzielten. Ausführliche Erläuterungen zur statistischen Auswertung sind Kap. 2.3.1 zu entnehmen. Für eine genauere Darstellung der quantitativen Intensitätsunterschiede siehe Abb. 3.13 im speziellen Ergebnisteil Mäuse.



**Abb. 3.8** Signifikant veränderte Proteine beim Vergleich WT/Myo<sup>-/-</sup> (Mäuse). Die Identifikation der Spots ist bereits vorweggenommen (Näheres: Kap. 3.3). Dargestellt ist ein überarbeiteter Plot des Statistikprogrammes SAM (Erläuterungen in Kap. 2.3.1). Aufgrund mehrerer Fragmentierungen und einer vermeintlichen Spleißvariante der NSGPx (145) verteilen sich 16 Proteine auf die 21 signifikanten Spots (je n=24 Gele).

### 3.1.4 Identifikation signifikanter Proteine

Signifikante (und einige der im Hundexperiment besonders gering veränderten) Proteine wurden wie in Kap. 2.1.6 und 2.1.7 beschrieben mittels ESI-MS/MS oder unmittelbar über die „HSC-2DPAGE“-Proteindatenbank identifiziert. Abb. 3.9 gibt exemplarisch ein Massenspektrum des ersten Proteinspots aus Tab. 3.1 (Nr. 252) wieder und verdeutlicht die Ermittlung der hier zugrunde liegenden Aminosäureabfolge ALMDEVVK (internationaler Einbuchstabenkode).



**Abb. 3.9 Peptidsequenzanalyse mittels ESI-MS/MS-Spektrum.** Stellvertretend ist für den ersten Proteinspot aus Tab. 3.1 (Nr. 252) die Ermittlung der Aminosäureabfolge ALMDEVVK (AS-Position 354-361 im Protein) dargestellt. Nomenklatur der Aminosäuren entsprechend des internationalen Drei- und Einbuchstabenkodes. a = m/z bezogen auf die Aminotermini. y = m/z bezogen auf die Carboxytermini. \*) m/z abzüglich einer Aminogruppe. \*\*) m/z mit zweifacher Protonierung (230). Weitere Abkürzungen im Verzeichnis.

Bei Untersuchung der Blutflussheterogenität gelang eine Identifikation in 8 von 12 der signifikanten Fälle. 3 Spots mit geringer Proteinmenge konnten nicht massenspektrometrisch sequenziert werden. Bei einem weiteren Protein ließen sich zwei kurze Peptidsequenzen (ELVDALL und LDVLQL) ermitteln, die aber zu keinem Ergebnis bei der Datenbankrecherche führten.

Sämtliche 21 signifikant veränderten Proteine aus der Untersuchung zur Myoglobindefizienz hingegen wurden alleine mit Hilfe der ESI-Tandemmassenspektrometrie identifiziert.

In Tab. 3.1 und Tab. 3.3 des folgenden speziellen Ergebnisteils sind mit Hilfe von Datenbankenrecherche für alle identifizierbar gewesenen Spots Peptidsequenzen, Proteinbezeichnung, weitere Informationen zum Auffinden in anderen Datenbanken sowie die Anzahl aller Aminosäuren und daraus berechnete Größen wie  $M_r$  und IEP aufgeführt.

## 3.2 Durchblutungsheterogenität und lokales Proteom

### 3.2.1 Proteomanalyse

In Tab. 3.1 sind zunächst alle identifizierten Proteine des Hundexperimentes zur Übersicht mit Spotnummer, Namen und weiteren Charakteristika aufgelistet. Die Recherchen erfolgten mittels der „Mascot“- bzw. „Blast“- Internettools oder im Falle nicht ausreichend eruierbarer ESI-MS/MS-Peptidsequenzen mit der „HSC-2D-PAGE“-Datenbank (vgl. Kap. 2.1.7). Proteinidentifikation unter Zuhilfenahme Letzterer sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Nicht alle ermittelten Sequenzen sind aufgeführt. Insgesamt vier der signifikanten Proteinspots (78, 167, 423, 454) konnten nicht identifiziert werden und fehlen in der Auflistung (vgl. Abb. 3.10).

Im Tabellenabschnitt „NF  $\approx$  HF“ finden sich 9 ausgewählte Markerproteine (vgl. Abb. 3.2) mit annähernd gleichem Expressionsniveau in Niedrigfluss- und Hochflussarealen ( $\Delta$ Spotvolumen NH/HF und vice versa  $\ll$  30 %) bei fehlender Signifikanz ( $P \gg 0,05$ ). Spalte 4 gibt die Swiss-Prot-Kennung der Proteine wieder. Unter <http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl> sind damit weitere Informationen und Links abrufbar. Mit wenigen Ausnahmen lassen sich auch die theoretische relative Molekularmasse  $M_r$  sowie der theoretische isoelektrische Punkt IEP bezogen auf die vollständige Aminosäurenabfolge (AS = Anzahl der Aminosäuren) des Ausgangsproteins berechnen (Spalte 5-7).

Abb. 3.10 gibt im Anschluss eine vergleichende Zusammenschau aller signifikanten Expressionsunterschiede wieder. Proteine mit Beteiligung an den selben Stoffwechselwegen sind durch Schattierungen gruppiert und zusätzlich durch rote gestrichelte Linien bezüglich der Richtung ihrer Expressionsänderung zusammengefasst. Innerhalb dieser Untergruppen entspricht die Reihenfolge von links nach rechts dem sinkenden Signifikanzniveau. Das Myoglobin ist zur besseren Übersicht neben seiner

**Tab. 3.1 Liste der identifizierten Proteine.** Nomenklatur der Aminosäuren entsprechend des internationalen Einbuchstabenkodes. Mehrere Spotnummern für nur ein Protein erklären sich durch dessen Fragmentierung im 2D-PAGE-Gel. Spalte 4 = Swiss-Prot-Kennung der Proteine.  $M_r$  = Theoretische relative Molekularmasse. IEP = Theoretischer isoelektrische Punkt bezogen auf die vollständige Aminosäurenabfolge. AS = Anzahl der Aminosäuren des Ausgangsproteins. \*) Identifikationen unter Zuhilfenahme der „HSC-2D-PAGE“-Datenbank. °) mitochondrial, Precursorprotein. †) relative Molekularmasse des unmodifizierten Precursorproteins.

Untersuchung Blutflussheterogenität						
Spot-Nr.	Peptidsequenzen	Proteinidentifikation	Primary Accession No. / Entry Name	M <sub>r</sub>	IEP	AS
NF > HF						
252	ALMDEVVK IVFPVDFVTGDK NMQIGASLFDEEGATIVK	Phosphoglyceratkinase 2 (PGK2)	P09041 (Maus) PGK2_MOUSE	44779,91	6,70	416
273	LAVSTVPVADALHLK QHQLYVGVLSK	N <sup>6</sup> , N <sup>6</sup> -Dimethyl-L-Arginin Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1)	O08557 (Ratte) DDH1_RAT	31294,82	5,76	284
350	IVSNASCTTNCPLAK GAAQNIIPASTGAAK	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Q28259 (Hund) G3P_CANFA	6682,68	6,01	63
NF < HF						
134	NISEAEEWYK	Desmin	P17661 (Mensch) DESM_HUMAN	53404,60	5,21	469
135	FASEASGYQDNIAR MALDVEIATYR					
302	LLLPLYLMEALR TYESLLDFTK LVEVIKTPMTSQK	Short Chain-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) <sup>o</sup>	Q61425 (Maus) HCDH_MOUSE	34464 <sup>†</sup>		314
371	QVETVEDLVAK LSVISVEDPPQR IEVIKPGDLGVDLTSK	Electron Transfer Flavoprotein (ETF <sub>β</sub> ); β--Untereinheit	P38117 (Mensch) ETFB_HUMAN	27843,61	8,25	255
489	HGNTVLTALGGILK VETDLAGHGQEVILIR GLSDGEWQIVLNIWVK	Myoglobin	P02158 (Hund) MYG_CANFA	17205,72	7,33	153

Untersuchung Blutflussheterogenität (Fortsetzung)						
Spot-Nr.	Peptidsequenzen	Proteinidentifikation	Primary Accession No./Entry Name	M <sub>r</sub>	IEP	AS
			NF ≈ HF			
165 *		ATP-Synthase; β-Kette°	P06576 (Mensch) ATPB_HUMAN	56560 <sup>†</sup>		529
255 *	TPYTDVNIVTIR	Isocitratdehydrogenase; α-Untereinheit, NAD <sup>+</sup> -spez.°	P50213 (Mensch) IDHA_HUMAN	39591,69	6,46	366
297 *		Tropomyosin; α -Kette	P09493 (Mensch) TPM1_HUMAN	32708,57	4,69	284
312	VPSVLAWVQETIAGN YVMLPVADQDK	Haptoglobin; α- u. β-Untereinheit	P19006 (Hund) HPT_CANFA	36457,37	5,72	329
410 *		Myosin (MLC 1); leichte Kette 1, Fasertyp I, ventrikuläre Isoform	P08590 (Mensch) MLEV_HUMAN	21800,87	5,03	194
472 *		Myosin (MLC 2); regulatorische leichte Kette 2, ventrikuläre Isoform	P10916 (Mensch) MLRV_HUMAN	18658,10	4,92	165
502	VLNSFSDGLK LLIVYPWTQR	Hämoglobin; β-Kette	P02056 (Hund) HBB_CANFA	15996,37	7,96	146
509	SLGVGFATR LGVFEDETTADDR	Fatty Acid Binding Protein (FABP); Herz	P05413 (Mensch) FABH_HUMAN	14726,84	6,34	132
516	TLVGYDLVPEPK QNGISTPEELGLDVK	Cytochrom c-Oxidase; Polypeptid Va	P00426 (bovine) COXA_BOVIN	12436,10	5,01	109

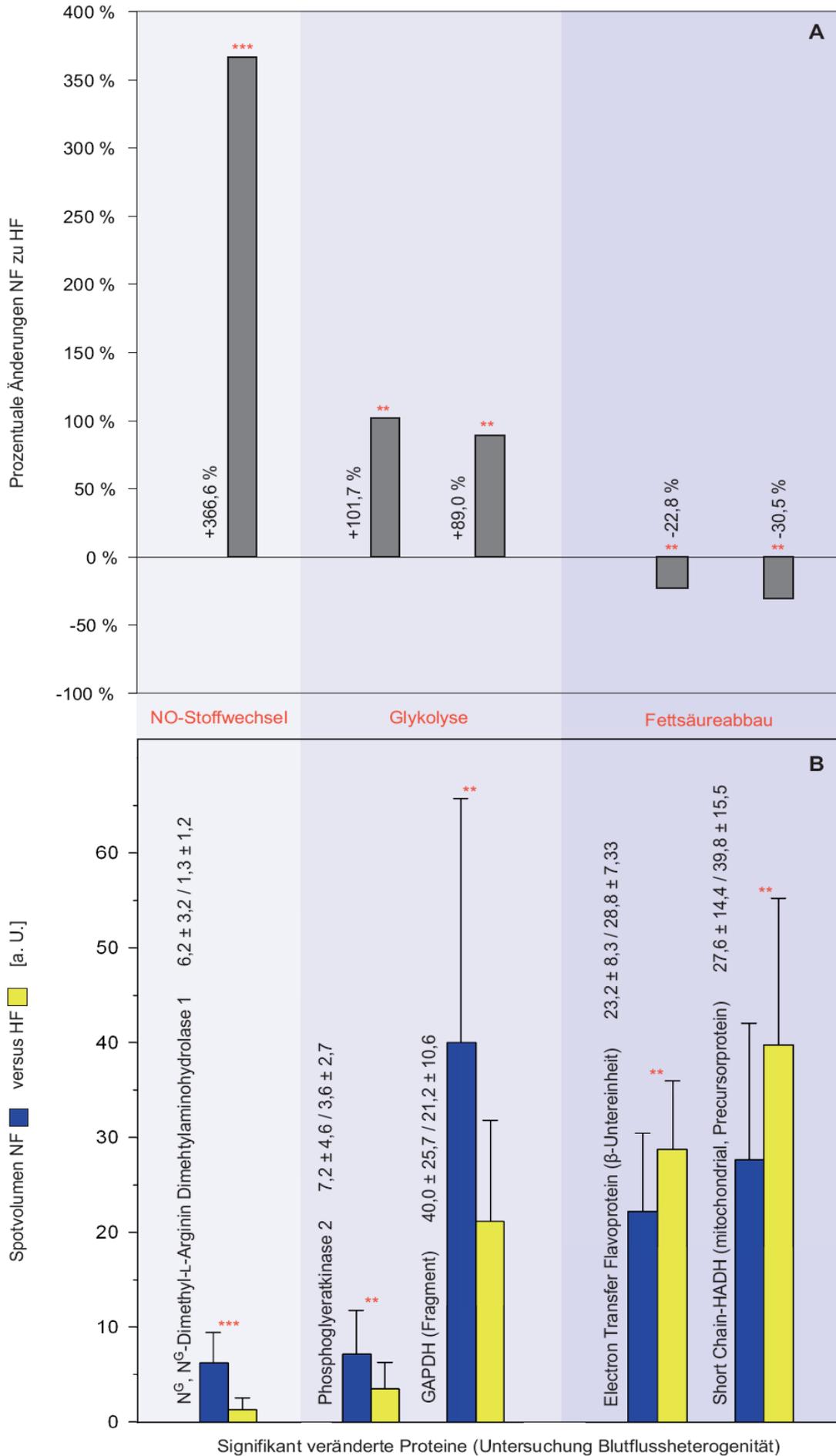
rechten Bezugsordinate dargestellt (Diagramm D). Wie im allgemeinen Ergebnisteil bereits dargestellt, wies im Hundexperiment das Protein DDAH1 den sowohl größten signifikanten Expressionsunterschied (NF zu HF: + 367 %) als auch die höchste Signifikanz in beiden t-Tests ( $P < 0,001$ ) auf. Es handelt sich hierbei um das Enzym  $N^G$ ,  $N^G$ -Dimethyl-L-Arginin-Dimethylaminohydrolase 1, welches sein Substrat ADMA (asymmetrisches  $N^G$ ,  $N^G$ -Dimethyl-L-Arginin), einen potenten Inhibitor aller Isoformen der NO-Synthase (NOS) (14, 119, 155, 207), hydrolytisch spaltet und so mittelbar Einfluss auf den NO-Stoffwechsel nimmt (Kap. 4.1.2; Abb. 4.2, Seite 77).

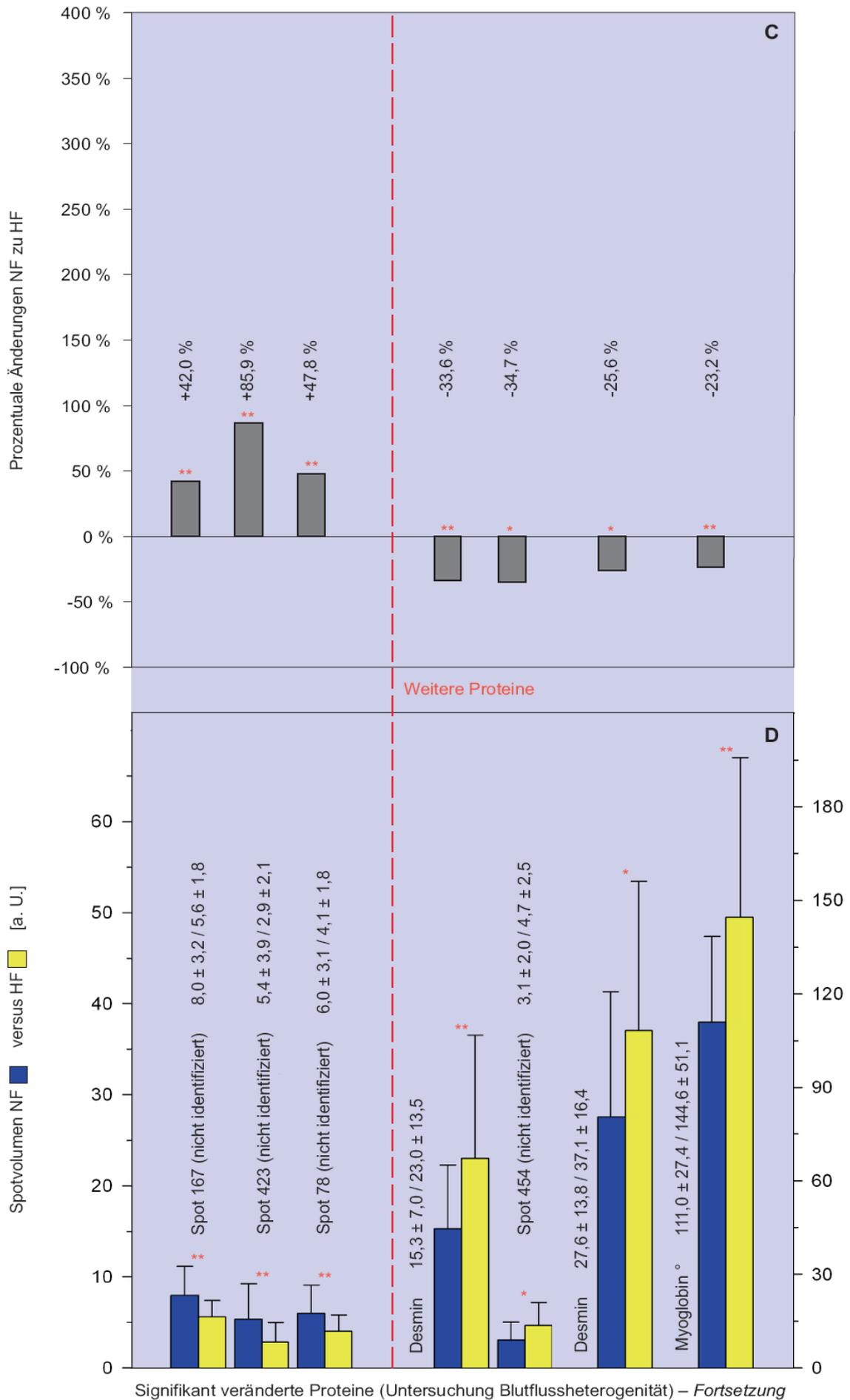
Die Veränderung 4 weiterer Proteine (Glykolyseenzyme PGK2 und GAPDH  $\uparrow$ ;  $\beta$ -Oxidationenzyme ETF und HADH  $\downarrow$ ; Kap. 4.1.3) legt im Energiestoffwechsel der NF-Areale eine Abnahme der Fettsäure- zu Gunsten der Glukoseoxidation nahe. Hier findet sich auch eine Reduktion des Gehaltes an Myoglobin und dem Intermediärfilament Desmin, welches ähnlich dem Vimentin um myozelluläre Z-Scheiben gruppiert ist und angrenzende Myofibrillen an diese verankert (77).

Eine grundsätzlich unterschiedliche Gewebebeschaffenheit der NF- und HF-Proben als Begründung für die hier gefundenen Veränderungen wird durch die im folgenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse der morphologischen Untersuchung einerseits und die Betrachtung der bereits erwähnten Markerproteine (NF  $\approx$  HF) andererseits unwahrscheinlich. Letztere legen einen vergleichbaren Gehalt an Myofibrillen (Tropomyosin, Myosin [MLC 1 und 2]), Mitochondrien (ATP-Synthase, Isocitratdehydrogenase, Cytochrom c-Oxidase), Erythrozyten (Hämoglobin) und Plasma (Haptoglobin) nahe.

**Abb. 3.10**      **Signifikant unterschiedliche Proteinexpressionen im Überblick.** Die unteren Säulen (Diagramme B und D) geben absolute Proteinexpressionen wieder. Hinter den Proteinbezeichnungen folgt die Angabe der Spotvolumina mit willkürlichen Einheiten [a. U.]. Die oberen Säulen (Diagramme A und C) verdeutlichen die prozentualen Veränderungen der NF- im Vergleich zu den HF-Proben. Signifikanzangaben beziehen sich immer auf verbundene und unverbundene t-Tests.  $n=30$  NF- und  $n=30$  HF-Proben. °) für das Myoglobin gilt die rechte Ordinate in Diagramm D.

### 3.2 DURCHBLUTUNGSHETEROGENITÄT UND LOKALES PROTEOM





### 3.2.2 Ergänzende morphologische Untersuchung

Unter Verwendung von n=6 NF- und n=6 HF-Proben aus einem Herzen wurden 288 EM- (Mitochondrien) sowie 288 LM-Digitalphotos (Kapillaren) mit jeweils 144 Aufnahmen von NF- und 144 Aufnahmen von HF-Arealen erstellt. Ihre Auswertung erfolgte hinsichtlich der Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit blind mit einer Punktgittermethode (168) (Kap. 2.2.3). Abb. 3.11 und Abb. 3.12 zeigen verkleinert repräsentative EM- resp. LM-Bilder.

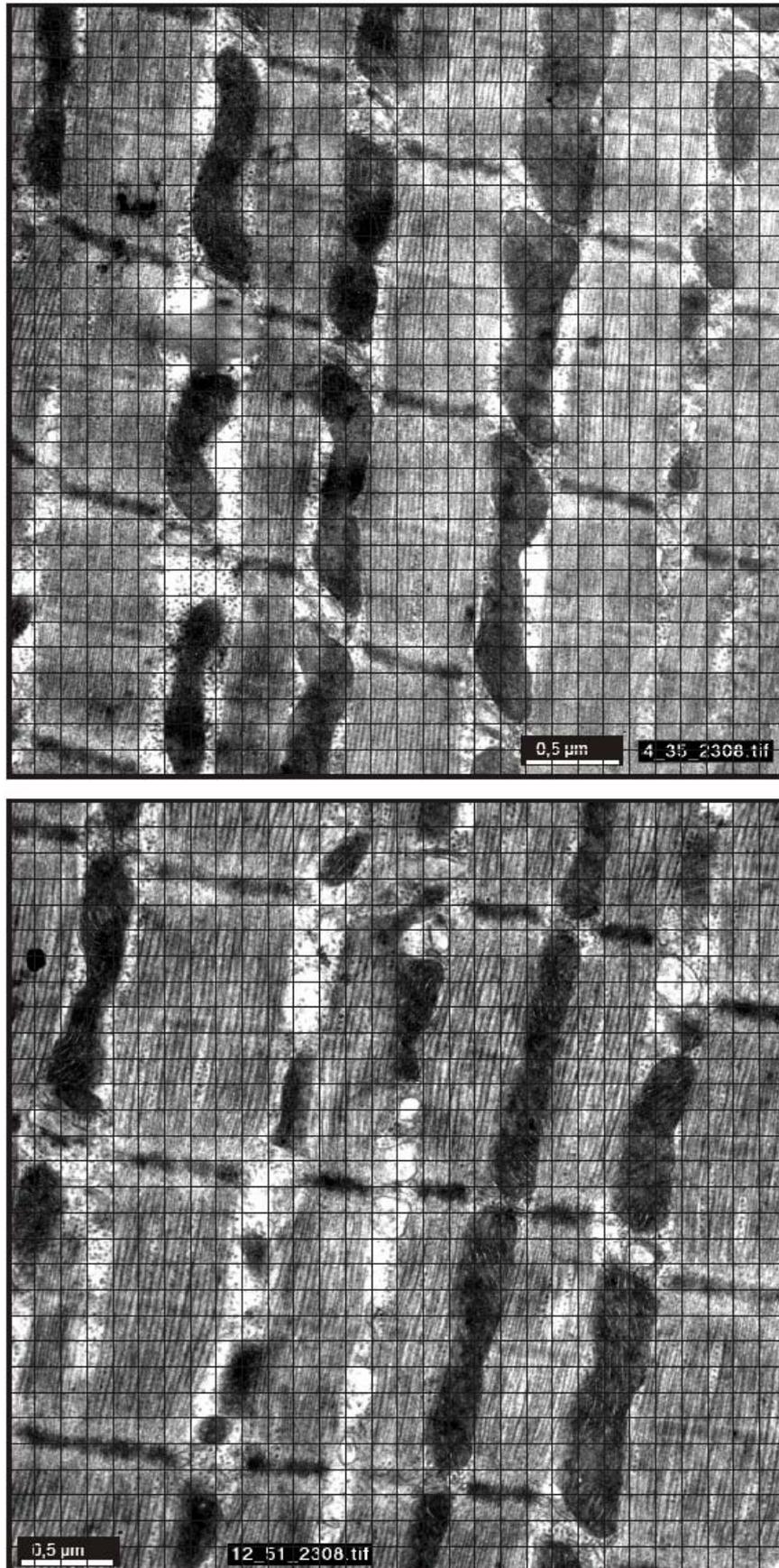
Der prozentuale Volumenanteil der Kapillaren am myokardialen Gewebe war in Niedrig- und Hochflussarealen gleich groß, unabhängig davon, ob ausschließlich das Kapillarlumen oder die Kapillare samt ihrer Gefäßwand berücksichtigt wurde. Auch beim prozentualen mitochondrialen Volumenanteil war kein signifikanter Unterschied nachweisbar (jeweils  $P \gg 0,05$  bei nur geringfügig unterschiedlichen Prozentbeträgen).

Tab. 3.2 fasst sämtliche t-Test-Ergebnisse sowie die über NF-, HF- und alle Proben gemittelten prozentualen Volumenanteile mit deren Standardabweichung für Mitochondrien und Kapillaren zusammen.

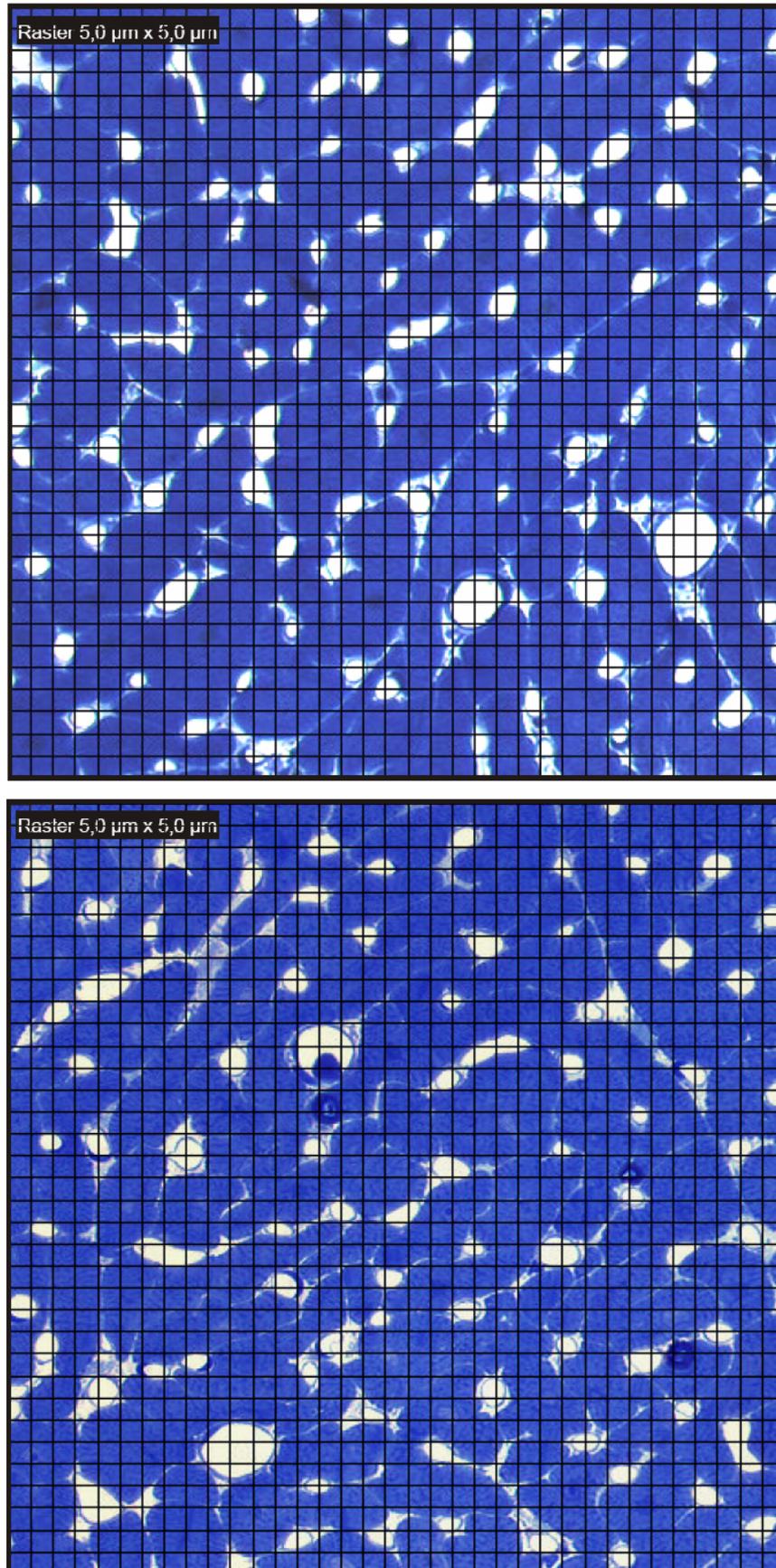
Untersuchung	$\bar{V}_A$ [%]* im NF	$\bar{V}_A$ [%]* im HF	t-Tests <sup>1</sup>	$\bar{V}_A$ [%]* gesamt
Mitochondrien	15,2 ± 4,3	17,7 ± 1,5	P > 0,22	16,5 ± 6,5
Kapillaren <sup>2</sup>	9,6 ± 1,0	9,3 ± 0,7	P > 0,64	9,4 ± 1,3
	9,4 ± 1,0	9,2 ± 0,7	P > 0,71	9,3 ± 1,3

**Tab. 3.2 Ergebnisse der morphologischen Untersuchung.** 1) Sowohl unverbundener als auch verbundener t-Test. 2) Die Werte der letzten Zeile berücksichtigen anders als die der vorletzten nur das Kapillarlumen, nicht jedoch die kapillaren Gefäßwände. \*) Über die jeweiligen Proben gemittelter prozentualer Volumenanteil am myokardialen Gewebe nach der Präparation für die Mikroskopie.

Wie früher unter jedoch anderen Bedingungen schon einmal gezeigt (194), liefern demnach die hier untersuchten Strukturen kein morphologisches Korrelat zu den zeitlich stabilen Unterschieden im lokalen myokardialen Blutfluss (117), d. h. Niedrig- und Hochflussareale weisen keine Unterschiede in den hier untersuchten morphologischen Parametern auf.



**Abb. 3.11** Repräsentative EM-Aufnahmen mit vergleichbaren mitochondrialen Gewebenvolumenanteilen (oben: NF-Areal; unten: HF-Areal). Die Schnitttrichtung verläuft längs der Mitochondrien und Myofibrillen. 25.000fache Vergrößerung. Kontrastmittel: Uranylacetat. Schnittdicke: ultradünn (0,05 µm).  $31 \times 31 = 961$  Gitterpunkte (einschließlich des Randes).



**Abb. 3.12** Repräsentative LM-Aufnahmen mit vergleichbaren kapillaren Gewebeteilanteilen (oben: NF-Areal; unten: HF-Areal). Die Schnitttrichtung verläuft quer zu Kapillaren und Myofibrillen. 400fache Vergrößerung. Färbung: Toluidinblau O. Schnittdicke: semidünn (1 µm).  $36 \times 36 = 1296$  Gitterpunkte (einschließlich des Randes).

### 3.3 Myoglob indefizienz und myokardiales Proteom

In Tab. 3.3 sind alle identifizierten Proteine des Mäuseexperimentes erneut zur Übersicht mit Spotnummer, Namen und weiteren Charakteristika aufgelistet. Hier erfolgten - anders als im Hundeexperiment (Kap. 3.2.1) - die Recherchen ausschließlich mittels der „Mascot“- bzw. „Blast“- Internettools, da von allen Proteinen ausreichend ESI-MS/MS-Peptidsequenzen gewonnen werden konnten. Nicht alle ermittelten Sequenzen sind aufgeführt.

Wiederum ist die Swiss-Prot-Kennung (Spalte 4) sowie die berechnete theoretische relative Molekularmasse  $M_r$  und der theoretische isoelektrische Punkt IEP der Proteine angegeben (Spalte 5-7). Spot 343 und 908 kodieren das gleiche Enzym. Der Verschiebung des isoelektrischen Punktes in den sauren Bereich bei Variante 908 liegt eine vermeintliche Spleißvariante (Folge: 123A → 123D) (145) zu Grunde (vgl. Abb. 3.4 und Abb. 3.6)

Abb. 3.13 gibt abschließend eine vergleichende Zusammenschau aller signifikanten Expressionsunterschiede wieder, wobei - wie in Abb. 3.10 - die Proteine in dieser Reihenfolge nach der Beteiligung an Stoffwechselwegen, der Richtung ihrer Expressionsänderung und dem Signifikanzniveau von links nach rechts geordnet sind.

10 der 21 im Mäuseexperiment signifikant unterschiedlichen Proteine sind dem Fettstoffwechsel und davon 9 der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation (43) zugehörig (Kap. 4.2.2; Abb. 4.5, Seite 88). Mit vier Ausnahmen - in allen Fällen Fragmente der  $\alpha$ -Untereinheit des Mitochondrialen Trifunktionalen Proteins (MTP, ein membrangebundenes [IMM]  $\alpha_4\beta_4$ -Heterooktamer mit drei für langkettige Fettsäuren spezifischen Enzymaktivitäten: Enoyl-CoA-Hydratase, Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase [beide:  $\alpha$ -Untereinheiten] sowie Ketoacyl-CoA-Thiolase [ $\beta$ -Untereinheiten]) (204) - fanden sich diese 10 Proteine bei den Myo<sup>-/-</sup>-Mäusen geringer exprimiert. Die Familie der Acyl-CoA-Dehydrogenasen (1. Schritt der  $\beta$ -Oxidation) ist hierbei mit zwei löslichen für kurzkettige (bis 12 C-Atome) resp.

**Tab. 3.3 Liste der identifizierten Proteine.** Nomenklatur der Aminosäuren entsprechend des internationalen Einbuchstabenkodes. Mehrere Spotnummern für nur ein Protein erklären sich durch dessen Fragmentierung im 2D-PAGE-Gel. Spalte 4 = Swiss-Prot-Kennung der Proteine.  $M_r$  = Theoretische relative Molekularmasse. IEP = Theoretischer isoelektrische Punkt bezogen auf die vollständige Aminosäurenabfolge. AS = Anzahl der Aminosäuren des Ausgangsproteins. °) mitochondrial, Precursorprotein. †) relative Molekularmasse des unmodifizierten Precursorproteins

Untersuchung Myoglobindefizienz						
Spot-Nr.	Peptidsequenzen	Proteinidentifikation	Primary Accession No./Entry Name	M <sub>r</sub>	IEP	AS
WT > Myo <sup>-/-</sup>						
111	VEFDTFGELK AIEMLGGELGSK VAALTGLPFVTAPNK	Fumarat-Hydratase <sup>o</sup>	P97807 (Maus) FUMH_MOUSE	54370,76	9,12	507
156	FLQENLAPK, VPAANVL SQESK, IGQFQLMQGK	Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (Precursor)	Q9JHI5 (Maus) Q9JHI5 (Maus)	46325,40	8,53	424
254	PPTYADLGK, VTQSN FAVGYK, LTL SALLDGK	Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1	Q60932 (Maus) POR1_MOUSE	32351		296
315 316	NSSVGLIQLNR FLSHWDHTR SLAMEMVLT DGR	Enoyl-CoA-Hydratase <sup>o</sup>	P14604 (Ratte) ECHM_RAT	31516,40	8,40	290
343	PGG LLLGDEAPNFEANTTIGR, DINAYNGETPTEK, LSILYPATTGR	Peroxiredoxin 6 (→ NSGPx ≐ Non-Selenium Glutathion- Peroxidase [EC 1.11.1.7])	O08709 (Maus) PDX6_MOUSE	24739		223
349	DFANVYDAVK VAPLGAELQESAR KTKAQSVIDK	Apolipoprotein A-I (Precursor)	Q00623 (Maus) APA1_MOUSE	30587 <sup>+</sup>		264
385	GDVTTQVALQPALK RDFGSFEKFK AIWNVINWENVTER	Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) <sup>o</sup>	P09671 (Maus) SODM_MOUSE	24603 <sup>+</sup>		222
399	APSWIDTGLSEMR HFSPEELK VLGDVIEVHGK	α-KrySTALLIN; B-Kette	P23927 (Maus) CRAB_MOUSE	20069		175

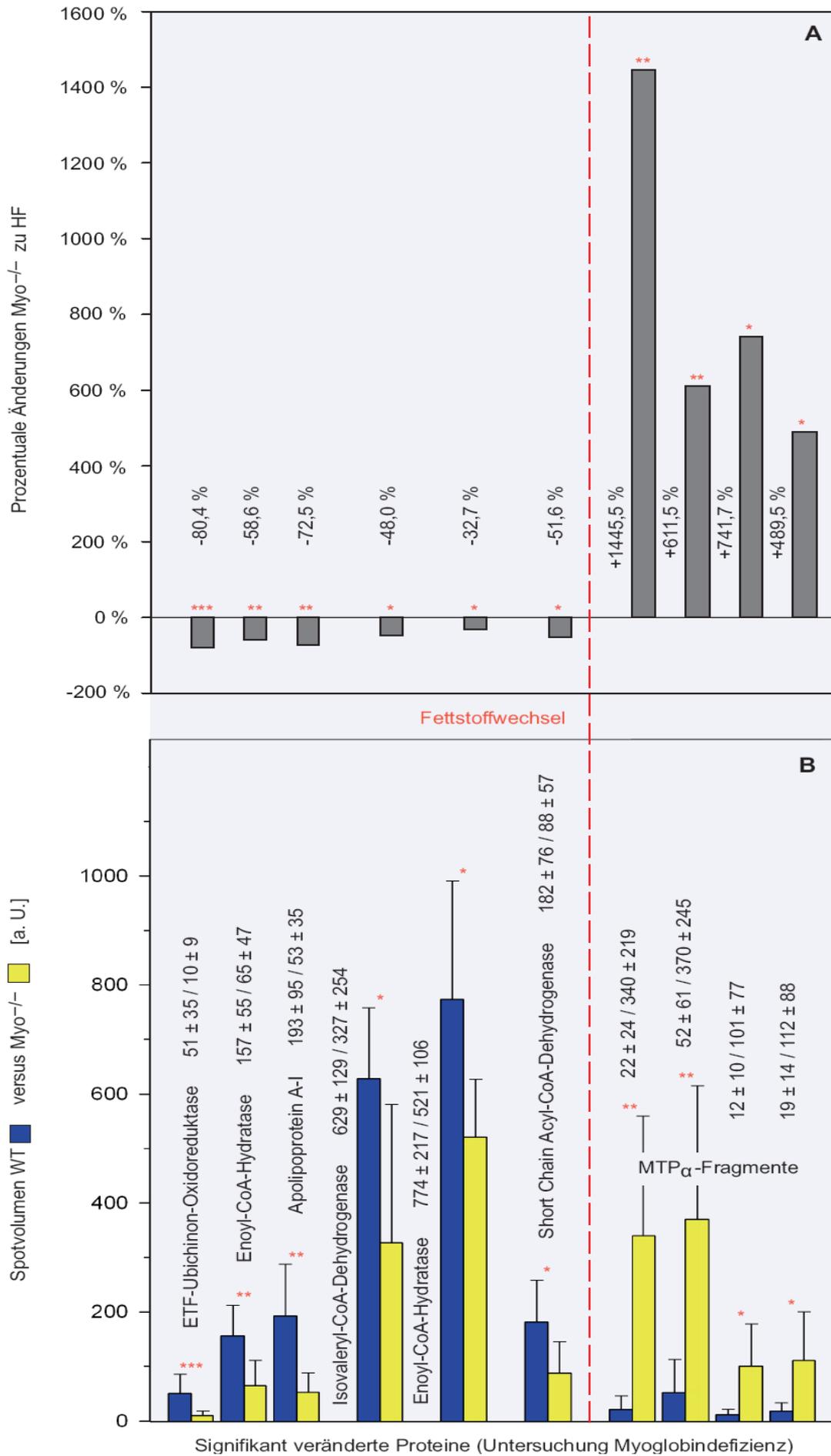
Untersuchung Myoglobindeizienz (Fortsetzung)						
Spot-Nr.	Peptidsequenzen	Proteinidentifikation	Primary Accession No./Entry Name	M <sub>r</sub>	IEP	AS
572	DFAEKELVPIAAQLDR, IGIASQALGIAQASLDCAVK, ITEIYEGTSEIQR	Short-Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase°	Q07417 (Maus) ACDS_MOUSE	44946,70	8,96	412
636	GAPLNTPVTEDR ALNEGGLQSIK ASCDAAQTYGIGLK	Electron Transfer Flavoprotein- Ubichinon-Oxidoreduktase°	Q16134 (Mensch) ETFD_HUMAN	68507,48	7,31	617
WT < Myo <sup>-/-</sup>						
35	NAVITPAYFNDSQRVINEPTA, AALAYGLDK, LLGQFTLIGIPPAPR	Heat Shock Protein 74 (HSP74); auch: Mitochondriales Stress-70-Protein°	P38647 (Maus) GR75_MOUSE	73528 <sup>+</sup>		679
282	LVINGKPITIFQER VPTPNVSVVDLTCR LISWYDNEYGYSNR	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	P16858 (Maus) G3P_MOUSE	35679		332
292 387	QMSLLLR, FENAFLSHVISQHQQLLGNIR, EIVTNFLAG	ATP-Synthase; α-Kette°	Q03265 (Maus) ATPA_MOUSE	59752 <sup>+</sup>		553
483	GIRICRKG HLKDTQLQLDDAV FNHHMFVLEQE	Myosin; schwere Kette, α-Isoform, Herzmuskel	Q02566 (Maus) MYH6_MOUSE	223564		1938
570 861 896 899	DRAKMMGLV, EGILATPEEGDIGAVFGLG, VIRILQEG, NTLNKEVQS	Trifunktionales Enzym; auch: Mitochondriales Trifunktionales Protein; α-Untereinheit (MTP <sub>α</sub> )	Q64428 (Ratte) ECHA_RAT	82512,92	9,11	763
908		siehe Spot-Nr. 343				

verzweigt-kettige (insbesondere Isovaleryl) (92) Fettsäuren spezifischen Mitgliedern vertreten, während die Enoyl-CoA-Hydratase (2. Schritt der  $\beta$ -Oxidation; hier: ebenfalls lösliche und für kurzkettige Fettsäuren spezifische Isoenzyme) zwei Spots (315 und 316) auf sich vereint. Zur ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase (IMM) siehe Kap. 4.1.3. Das Apolipoprotein A-1 hingegen ist als Bestandteil u. a. der „High Density Lipoproteine“ (HDL) und Aktivator der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) in den Serumlipidtransport involviert (124).

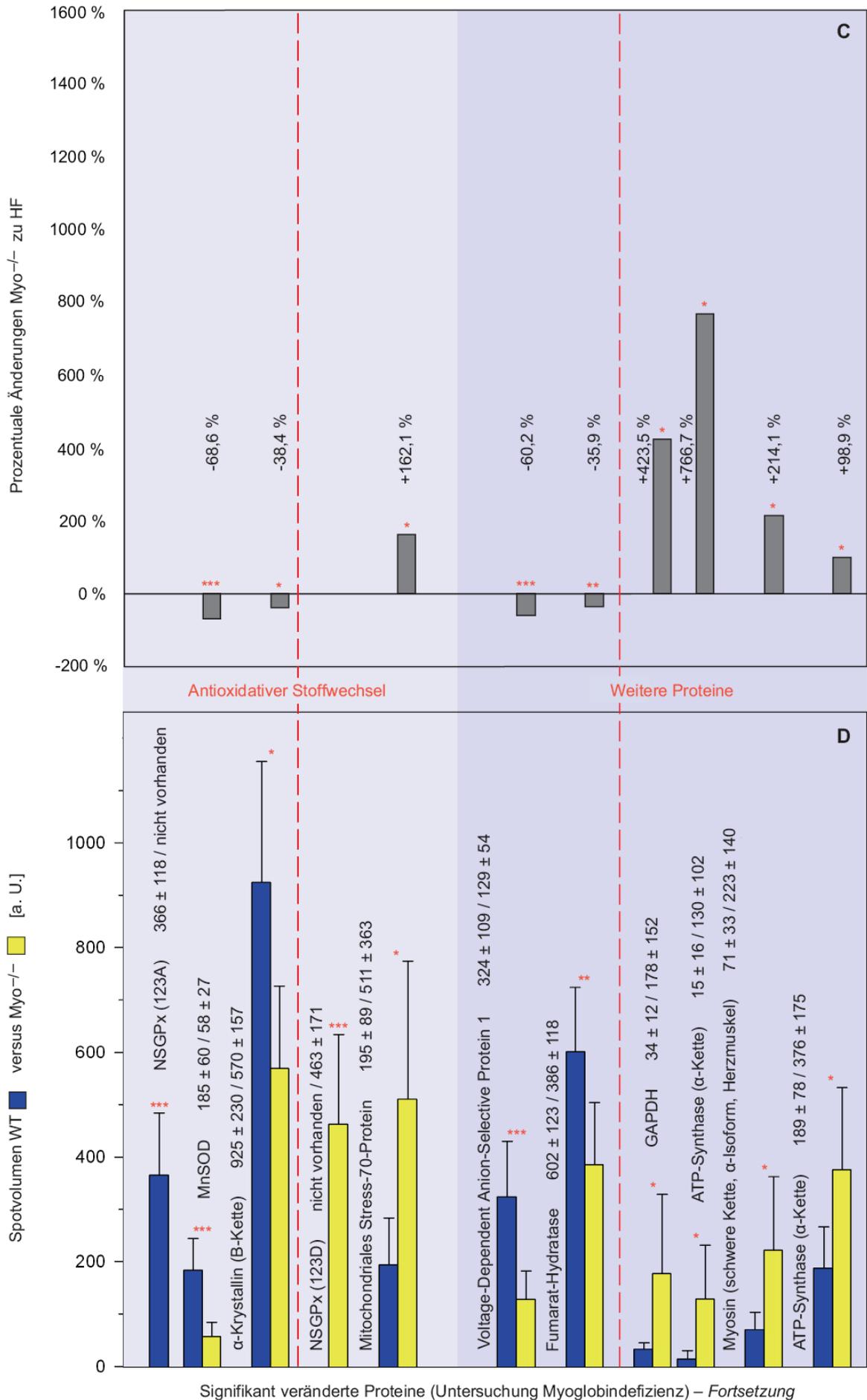
5 der veränderten Proteine nehmen am antioxidativen Stoffwechsel teil. Dazu gehört mit der signifikantesten Expressionsänderung im Mäuseexperiment (SAM und unverbundener t-Test) die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD; Myo<sup>-/-</sup> zu WT: -68,6 %; P < 0,00001). Keine Änderung der Proteinmenge, jedoch eine gemessene Verschiebung des isoelektrischen Punktes (IEP) von pH 6,42 im WT (Spot 343) nach pH 6,05 im Myo<sup>-/-</sup> (Spot 908) wies die deshalb doppelt erfasste zytosolische Non-Selenium Glutathion-Peroxidase (NSGPx) auf. Bei der im Folgenden veranlassten cDNA-Sequenzanalyse fand sich als Erklärung eine bereits beschriebene (145) vermeintliche Spleißvariante, wobei an Position 123 der Myo<sup>-/-</sup>-Variante des Enzyms Alanin durch Aspartat ersetzt ist (berechnete IEP's: pH 5,98 im WT; pH 5,71 im Myo<sup>-/-</sup>). Die entgegenseitig veränderten Proteine  $\alpha$ -Krystallin (109, 162) sowie das Mitochondriale Stress-70-Protein (u. a. auch: HSP74, PBP74, Mortalin, Grp75) (30, 216) zählen beide zu den Chaperonen. Als gesichert gilt beispielsweise, dass diese „Katalysatoren“ die korrekte native Faltung von Proteinen beschleunigen (115, 124).

Unter „Weitere Proteine“ in Abb. 3.13 finden sich schließlich u. a. die ebenfalls durch zwei Spots vertretene  $\alpha$ -Kette der ATP-Synthase (IMM), das Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1 (VDAC 1; Funktion [u. a.]: Transporter für ATP (Efflux), ADP (Influx) und weitere Metabolite durch die äußere Mitochondrienmembran) (2, 75, 176, 177) - als Übersichtsartikel: (15, 31) - sowie die lösliche Fumarat-Hydratase und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als jeweils einzige Vertreter des Citratcyclus resp. der Glykolyse.

**Abb. 3.13**      **Signifikant unterschiedliche Proteinexpressionen im Überblick.** Die unteren Säulen (Diagramme B und D) geben absolute Proteinexpressionen wieder. Hinter den Proteinbezeichnungen folgt die Angabe der Spotvolumina mit willkürlichen Einheiten [a. U.]. Die oberen Säulen (Diagramme A und C) verdeutlichen die prozentualen Veränderungen der Myo<sup>-/-</sup>- im Vergleich zu den WT-Proben. Die Non-Selenium Glutathion-Peroxidase (NSGPx) ist wegen der auf einer vermeintlichen Spleißvariante (Folge: 123A  $\rightarrow$  123D) (145) beruhenden Verschiebung des isoelektrischen Punktes durch zwei einzelne Säulen vertreten. Signifikanzangaben beziehen sich immer auf unverbundene t-Tests (je n=12 Herzen).



### 3.3 MYOGLOBINDEFIZIENZ UND MYOKARDIALES PROTEOM



Signifikant veränderte Proteine (Untersuchung Myoglobindezizienz) – Fortsetzung

## 4 Diskussion

### 4.1 Heterogenität der myokardialen Durchblutung

Die in Kap. 1.2 beschriebene Heterogenität des myokardialen Blutflusses (mit einer mehr als 3-fach höheren Perfusion in HF als in NF-Arealen) und Metabolismus sowie die Ergebnisse der vorausgegangenen Mikrosphärenstudie (95, 117) mit Feststellung einer mindestens 13 Tage andauernden Flussmusterstabilität (NF-blieben NF- und HF- blieben HF-Areale ) haben Pendant auf Ebene der lokalen Proteinexpression. 12 von  $380 \pm 79$  Proteinen zeigten sich beim Vergleich von je  $n=30$  zweifach bestimmten NF- bzw. HF-Proben aus  $n=6$  Hundeherzen als unterschiedlich signifikant exprimiert. Die Änderungen betreffen in den durch geringeren Energiebedarf und -umsatz gekennzeichneten NF-Arealen insbesondere Proteine des NO-Stoffwechsels, der  $\beta$ -Oxidation sowie der Glykolyse und lassen somit in den NF-Arealen eine erhöhte NO-Bildung sowie einen Shift von der  $\beta$ -Oxidation zur Glykolyse vermuten. Beide Änderungen mögen Ausdruck eines homöostatischen Mechanismus zur Kontrolle von  $O_2$ -Angebot und -Nachfrage sein. Ungeachtet der Unterschiede in der Proteinexpression zeigte eine genaue morphometrische Analyse keine Unterschiede im Volumenanteil von Kapillaren und Mitochondrien. Dies bestätigte eine frühere Untersuchung (194) und stimmt mit der vergleichbaren Expression der allermeisten Proteine in NF- und HF-Arealen gut überein (darunter Markerproteine [NF  $\approx$  HF; Tab. 3.1] für Myofibrillen [Tropomyosin; Myosin mit MLC 1 und 2], Mitochondrien [ATP-Synthase; Isocitratdehydrogenase; Cytochrom c-Oxidase], Erythrozyten [Hämoglobin] sowie Plasma [Haptoglobin]).

In den sich anschließenden Unterkapiteln werden die hier beschriebenen Zusammenhänge genauer ausgeführt. Kap. 4.1.1 skizziert aber zunächst für die weitere Diskussion relevante Ergebnisse, welche in auf den Daten dieser Arbeit aufbauenden Untersuchungen (117) ermittelt wurden.

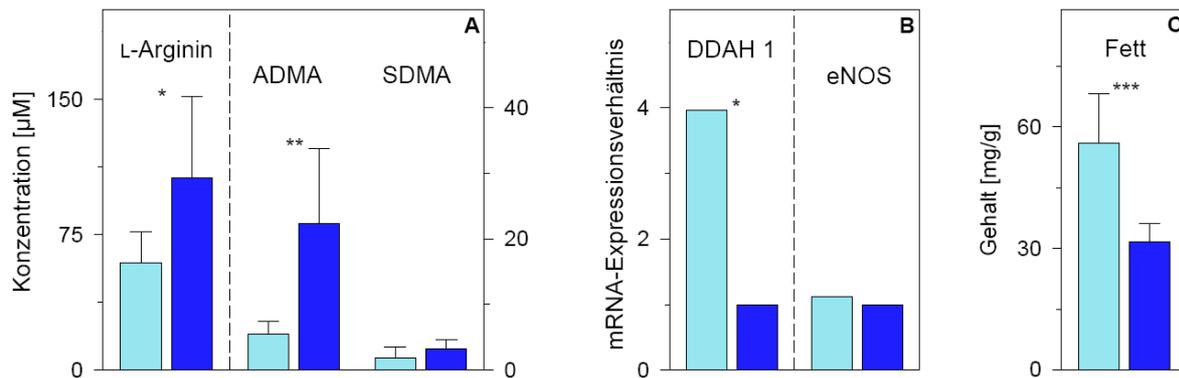
#### 4.1.1 Weiterführende Experimente

Im Falle der Untersuchung zur Durchblutungsheterogenität ließ sich anhand der drei folgend skizzierten Experimente (117) die funktionelle Relevanz der bisher erhobenen Daten untermauern.

Die erhöhte Expression der DDAH1 in NF-Proben könnte mit einer verringerten Konzentration ihres Substrates, des NOS-Inhibitors ADMA (119, 155, 207) und die daraus resultierende verminderte Hemmung der NOS mit einem erhöhten Verbrauch des für die NO-Synthese notwendigen L-Arginins einhergehen (Abb. 4.2, Seite 77). Bei Konzentrationsunterschieden NF zu HF auch anderer, nicht via DDAH1 hydrolytisch spaltbarer Methylarginine, wie beispielsweise dem NOS-indifferenten SDMA (119), müssten zusätzlich weitere Regulationsmechanismen dieser gemeinsam endogen synthetisierten Substanzgruppe (99, 119) näher in Betracht gezogen werden. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurden die Konzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin wie von Pettersson et al. (167) beschrieben per HPLC in n=11 NF- und n=10 HF-Proben (jeweils Hunde 3-7 aus Tab. 2.1) als Einzelmessung ermittelt. Diagramm A aus Abb. 4.1 fasst die Messergebnisse zusammen. In Einklang mit einer etwa auf das 4-fache erhöhten DDAH1-Aktivität im NF (nächster Abschnitt) war dort die ADMA-Konzentration auf ein Viertel verringert. Auch das L-Arginin war im NF erniedrigt, das SDMA zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Zur Feststellung, ob die verringerte Expression der DDAH1 im NF auch auf Transkriptionsebene nachweisbar ist, erfolgte mittels RTD-PCR eine entsprechende mRNA-Quantifizierung relativ zur Referenz-mRNA  $\beta$ -Aktin als Einfachmessung in jeweils n=3 NF- bzw. HF-Proben (Hunde 4, 6 und 7 aus Tab. 2.1). Auf gleiche Weise wurde auch der mRNA-Gehalt der eNOS im NF und HF miteinander verglichen, da diese eine zentrale Rolle in der NO-Bildung spielt und eine unterschiedliche Expression somit die Bedeutung der ADMA-Konzentrationsunterschiede hätte relativieren können. Wie Diagramm B aus Abb. 4.1 veranschaulicht, betrug das DDAH1-mRNA-Verhältnis NF zu HF etwa 4:1, wohingegen bezüglich der eNOS-mRNA kein signifikanter Unterschied gefunden werden konnte.

In je n=7 NF- resp. HF-Proben (Hunde 4 und 7 aus Tab. 2.1) wurde der auf das Feuchtgewicht (FG  $\approx$  5faches TG) bezogene totale Lipidgehalt einmal gravimetrisch bestimmt, um so eine mögliche Auswirkung des in NF-Proben vermuteten Stoffwechselshiftes von  $\beta$ -Oxidation in Richtung Glykolyse zu erfassen. NF-Areale wiesen dabei einen im Durchschnitt um 75 % höheren totalen Lipidgehalt als HF-Areale auf (NF/HF =  $56 \pm 12$  zu  $32 \pm 5$  mg/g FG; Diagramm C aus Abb. 4.1).



**Abb. 4.1 Ergebnisse der weiterführenden Experimente im Überblick.** Balken links der gestrichelten Linien beziehen sich auf die linken Ordinaten und vice versa. Diagramm B lässt keine Schlüsse auf das mRNA-Expressionsverhältnis zwischen DDAH 1- und eNOS-Proben zu. NF-Proben = hellblau, HF- Proben = dunkelblau. Anzahl der Myokardproben von links nach rechts: n=11 (NF); n=10 (HF) / je n=3 / je n=7. \* = signifikant ( $P < 0,05$ ), \*\* = sehr signifikant ( $P < 0,01$ ) und \*\*\* = hoch signifikant ( $P < 0,001$ ) im sowohl unverbundenen als auch verbundenen t Test.

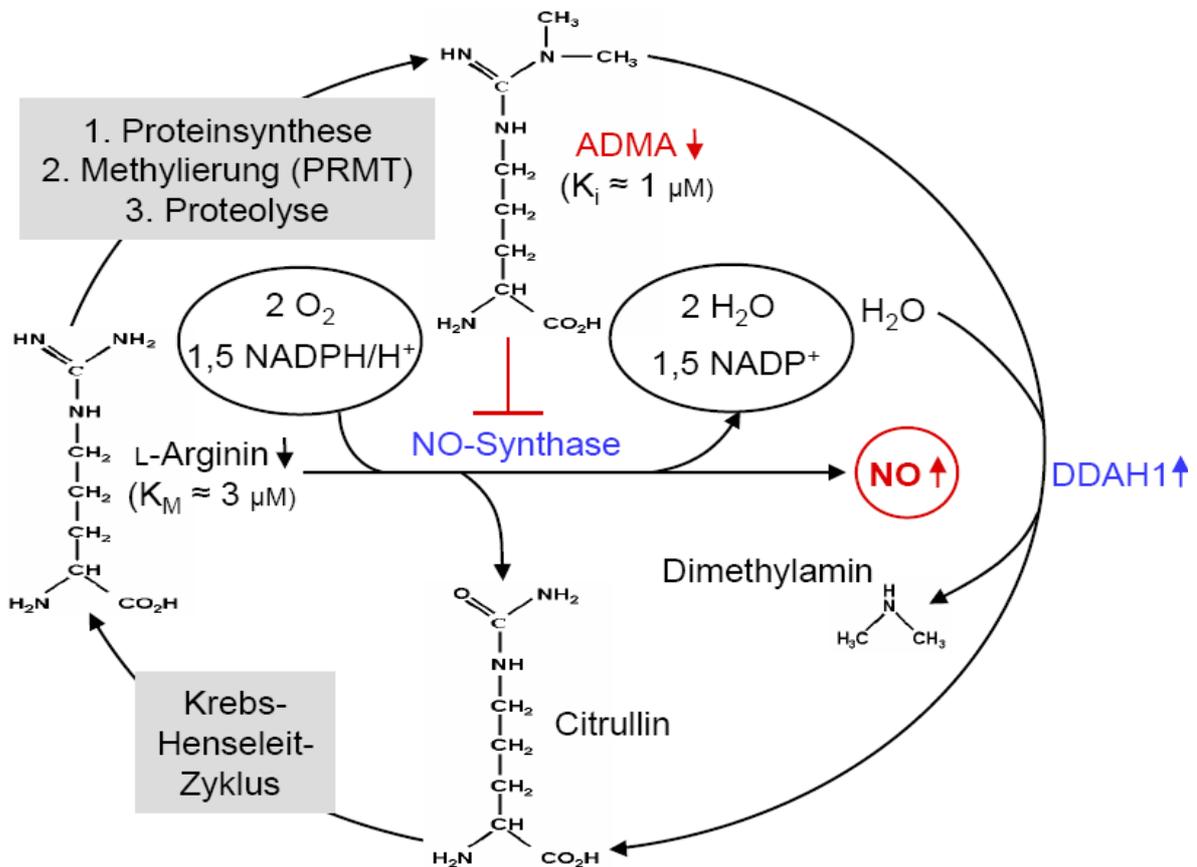
In der sich nun anschließenden Diskussion der eigenen Ergebnisse wird innerhalb einzelner Unterkapitel erneut Bezug auf die hier skizzierten Resultate genommen.

#### 4.1.2 NO-Stoffwechsel

Die DDAH1 wies den sowohl größten signifikanten Proteinexpressionsunterschied (NF zu HF: + 367 %) als auch die höchste Signifikanz in beiden t-Tests ( $P < 0,001$ ) auf. Es handelt sich dabei um eine Isoform des zytosolischen Enzyms  $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginin-Dimethylaminohydrolase, welches sein Substrat ADMA (asymmetrisches  $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginin), einen potenten Inhibitor aller Isoformen der NO-Synthase ( $K_{i, eNOS} \approx 1 \mu\text{M}$ ; zum Vergleich:  $K_{M, eNOS}$  bezüglich des L-Arginins  $\approx 3 \mu\text{M}$ ) (14, 119, 155, 207), hydrolytisch spaltet und auf diese Weise vermutlich die NO-Bildung in NF-Arealen steigern kann (Abb. 4.2). Für weitergehende Informationen bezüglich der DDAH (Synthese, Isoformen, Kolokalisationen mit NOS-Isoformen, etc) siehe (120, 149, 199, 201) – zur Übersicht: (119).

Da die signifikante Steigerung der DDAH1-Proteinexpression auch mit den Ergebnissen der mRNA-Untersuchung korreliert (hier: NF/HF = 3,97 zu 1; bei vergleichbarer eNOS [NF/HF = 1,12 zu 1]) (Abb. 4.1) ist von einer transkriptionellen Regulation dieses Enzyms auszugehen. Eine vergleichbare ADMA-Proteinumsatzrate in NF- und HF-Arealen vorausgesetzt, wäre die signifikante Verringerung der ADMA-

Konzentration (NF/HF = 1 zu 4,07 bei nicht signifikant veränderter SDMA) (Abb. 4.1) somit unmittelbare Folge einer hochregulierten DDAH1-Synthese. Die niedrigere L-Arginin-Konzentrationen im NF (NF/HF = 1 zu 1,79) (Abb. 4.1) hingegen erklärt sich dann durch einen gesteigerten L-Arginin-Verbrauch im Rahmen der NO-Bildung.



**Abb. 4.2 NO-Stoffwechselsituation in Niedrigflussarealen.** Die erhöht exprimierte DDAH1 führt konsekutiv zu einer verminderten NO-Synthaseinhibition durch ADMA was eine gesteigerte NO-Bildung zur Folge haben könnte. Der dann gesteigerte L-Arginin-Verbrauch würde so auch die gefundene Verringerung der L-Arginin-Konzentration erklären. Der Harnstoffzyklus ist wie dargestellt in geringem Ausmaße auch extrahepatisch in Kardiomyozyten möglich (124). PRMT = Protein-Arginin-Methyltransferase.  $K_M$  = Michaelis-Konstante (hier: für eNOS).  $K_i$  = Enzyminhibitionskonstante (hier: für eNOS).

Das in NF-Arealen (trotz der dort geringeren, die NOS aktivierenden Scherkräfte) möglicherweise gesteigerte NO vermittelt seine Wirkungen mitunter über cGMP – z. B. (5, 6, 23, 51, 83-85, 211, 229) - und führt dabei je nach Signaltransduktionsweg oder auch Zelltyp zu einer Vielzahl unterschiedlicher Effekte, von der Antiproliferation glatter Muskelzellen (146, 232) bis hin zur Hemmung der Blutplättchenaggregation (127). Durch Hydrolyse von cAMP mittels der cGMP-stimulierbaren Phosphodiesterase kann im Falle der NF-Areale eine Vasodilatation und damit einhergehend auch eine Steigerung des koronaren

Blutflusses sowie der O<sub>2</sub>-Versorgung die Folge sein. Damit einhergehend konnten in einer früheren Studie Gaben des NOS-Inhibitors L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-Methylester) den Blutfluss stärker in NF- als in HF-Proben reduzieren (193).

Zusätzlich induziert erhöhtes NO wahrscheinlich eine den O<sub>2</sub>-Verbrauch senkende Abnahme der myokardialen Kontraktilität (51, 83, 84, 157, 211), welche - ähnlich wie im Rahmen vagaler Gegenreaktionen (83) bzw. negativer Feedback-Mechanismen nach adrenerger Stimulationen (insbesondere über β<sub>3</sub>-Rezeptoren) (83, 211) - ebenfalls durch die Guanylatzyklase resp. cGMP, aber auch unbekannt anderweitig (84, 221) vermittelt ist. Die genaue - auch die Steuerung des intrazellulären Ionenmilieus beinhaltende - Modulation der Herzmuskelkontraktilität via NO jedoch umfasst mehrere verschiedene „Second-Messenger“-Systeme (103) und ist in Abhängigkeit der äußeren Einflüsse (103), Versuchsanordnungen (Ruhebedingungen versus adrenerge Stimulation; Gesundheitszustand versus induzierte Insuffizienz) (84) oder betrachteten NOS-Isoformen/Lokalisationen (84, 104) widersprüchlich bzw. gegensätzlich beschrieben. So wird der für die intrakardiomyozytären zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsschwankungen („Calcium-Cycling“: Undulation der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zwischen etwa 10 nM diastolisch und 100 nM systolisch) (166) maßgeblich mitverantwortliche L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanal (I<sub>Ca<sup>2+</sup>, L</sub>-Kanal) einerseits durch NO per Thiolgruppennitrosylierung direkt aktiviert (23, 84) und andererseits wiederum vermittels cGMP indirekt inaktiviert (5, 6, 23, 84, 85, 229). Ebenfalls direkt über Thiolgruppennitrosylierung aktivieren lassen sich sowohl der Ryanodinrezeptor (84, 229) als auch der Ionenkanal für die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-sensitive, langsame Komponente des verzögerten K<sup>+</sup>-Gleichrichterstromes (I<sub>K, s</sub>) (5, 6), während die Ca<sup>2+</sup>-Ionenfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum an die NO-Synthese der auch dort lokalisierten (228) NOS1 gebunden ist (104). Zumindest im Falle des K<sup>+</sup>-Stromes erscheint die Datenlage geringer widersprüchlich und zeigt eine NO-vermittelte Verkürzung des Aktionspotentialplateaus (via I<sub>K, s</sub>-Zunahme) (5, 6) auf, was schließlich auch in Einklang mit der den O<sub>2</sub>-Verbrauch senkenden Reduktion myokardialer Kontraktilität zu bringen wäre.

Darüber hinaus vermag NO (evtl. auch seine Folgeprodukte O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>, etc.) gemäß von Experimenten mit u. a. dem NO-freisetzenden SNAP

(S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin) den  $O_2$ -Verbrauch und Energieumsatz auch unmittelbar und cGMP-unabhängig (wahrscheinlich über einen evolutionär begründeten direkten Einfluss auf die mitochondriale Elektronentransportkette via Cytochrom c-Oxidase mit konsekutiv verminderter oxidativer Phosphorylierung) zu vermindern (227) - als Übersichtsartikel: (202).

In NF-Arealen scheint eine verminderte Inhibierung der NOS mit Steigerung der NO-Bildung demnach in mehrfacher Hinsicht zu einem geringeren Energieumsatz und  $O_2$ -Verbrauch beizutragen. Dieser Aspekt wird möglicherweise auch durch eine noch zu beschreibende (Kap. 4.1.4) verminderte NO-Inaktivierung in NF-Proben gestützt.

### 4.1.3 $\beta$ -Oxidation und Glykolyse

In HF-Proben finden sich die zwei zytosolischen Glykolyseenzyme PGK2 (katalysiert den 7. der 10 Glykolyse-schritte; -50,4 %) sowie GAPDH (Schritt Nr. 6; -47,1 %) vermindert. Die beiden löslichen mitochondrialen  $\beta$ -Oxidationsproteine ETF (Flavoprotein, dass die Reduktionsäquivalente aus dem von der Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysierten 1. Schritt der  $\beta$ -Oxidation vermittelt der ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase [innere Mitochondrienmembran] auf das Ubichinon der Atmungskette weiterleitet; +30,1 %) sowie HADH (katalysiert den 3. der 4  $\beta$ -Oxidationsschritte [hier: für kurzkettige Fettsäuren]; +43,9 %) hingegen sind verstärkt exprimiert (auch: Abb. 4.5, Seite 88).

Dies legt im Energiestoffwechsel der definitionsgemäß durch geringeren Blutdurchfluss und somit geringere  $O_2$ -Versorgung gekennzeichneten NF-Areale eine Abnahme der Fettsäure- zu Gunsten der Glukoseoxidation nahe (vice versa bei den HF-Proben). Ein ähnlicher Stoffwechselshift wurde auch schon bei anderen Proteomanalysen in Zusammenhang mit dilatativer Kardiomyopathie induziertem Herzversagen und Myoglobinmangel/-defizienz beschrieben (87, 152, 217, 218) (Kap. 4.2.2). In NF-Gebieten wäre die Umstellung aus energetischer Sicht von Vorteil, da Glukose trotz eines im Vergleich zu Fettsäuren geringeren physiologischen Brennwertes (etwa 16,6 kJ/g gegenüber 38 kJ/g bei z. B. Palmitinsäure [ $CH_3-(CH_2)_{14}COOH$ ]) im Rahmen ihrer Oxidation weniger  $O_2$  pro Mol produziertem ATP benötigt (125) (zum Vergleich bei selbigem Beispiel: 1 Mol [180 g] Glukose und 6 Mol  $O_2$  [134,5 l ideales Gas<sub>STPD</sub>] führen bei vollständig

aerober Glykolyse rein theoretisch zu etwa 32 Mol ATP [1 Mol ATP/4,02 l O<sub>2</sub>]; 1 Mol Palmitinsäure [256,4 g] und 23 Mol O<sub>2</sub> [515,5 l ideales Gas<sub>STPD</sub>] → 106 Mol ATP [1 Mol ATP/4,86 l O<sub>2</sub>]). Gemäß einer *In Vivo*-Untersuchung steigerte sich bei ausschließlicher  $\beta$ -Oxidation der in anderen Studien (80, 197) mit etwa 10-20 % veranschlagte zusätzliche O<sub>2</sub>-Verbrauch sogar auf 48 % (113). Auch weiße (schnelle) Muskelfasern scheinen ihr im Vergleich zu den roten (ausdauernden) Pendanten knapperes O<sub>2</sub>-Angebot mittels vermehrter Glykolyse effektiver zu nutzen (8). Für eine vergleichsweise Verringerung des den limitiert vorhandenen O<sub>2</sub> weniger effektiv nutzenden Fettsäureabbaus in NF-Arealen spricht neben der unterschiedlichen Enzymexpression - wenn auch nur indirekt - schließlich ebenfalls die dort gemessene Erhöhung des durchschnittlichen Lipidgehaltes um 75 % (Abb. 4.1).

Die im Gegenzug in den HF-Proben vermutlich gesteigerte  $\beta$ -Oxidation wäre ihrerseits konsistent mit der im Zuge früherer Studien in diesen Gebieten beschriebenen verstärkten Fettsäureaufnahme (22, 79). Auch weitere Beobachtungen einer vorangegangenen Untersuchung wie der proportional zum Blutfluss vermehrte Citratzyklusumsatz und Sauerstoffverbrauch (34) stehen in Einklang mit einer Betonung dieses bei ausreichendem O<sub>2</sub>-Angebot eine größere Energieversorgung garantierenden Stoffwechselweges.

Keine Übereinstimmung mit der bisherigen Datenlage gibt es jedoch in Bezug auf die in HF-Arealen vermindert exprimierten Glykolyseenzyme PGK2 und GAPDH. U. a. berichteten 1996 Sonntag et al. von einer in diesen Gebieten vermehrt stattfindenden Desoxyglukoseaufnahme sowie -phosphorylierung (36, 194). Signifikante Unterschiede bezüglich der Hexokinase- oder PGK-Aktivität konnten dabei nicht aufgefunden gemacht werden (194). Auch vor dem Hintergrund eines dreifach erhöhten Energieumsatzes der HF- im Vergleich zu den NF-Arealen (34) ist eine verminderte Glykolyserate trotz der vermutlich erhöhten Kapazität für die  $\beta$ -Oxidation zu hinterfragen. Es ist vielmehr denkbar, dass die absoluten Umsatzraten der Glykolyse und Fettsäureoxidation beide erhöht sind und dabei aber die relative Bedeutung der  $\beta$ -Oxidation in HF- im Vergleich zu NF-Gebieten zugenommen hat.

Studien, z. B. unter Nutzung der Isotopomerenanalyse (vgl. Kap. 4.2.5), sind nötig, um genaueren Aufschluss über die zwischen beiden Arealtypen bestehenden Unterschiede in der Substratverwertung zu erhalten.

Eine weitere, mit bevorzugter Fettsäureoxidation in HF-Proben stimmige Beobachtung schließlich ist in Kap. 4.1.4 beschrieben.

### 4.1.4 Sonstige Änderungen im Proteinexpressionsmuster

In den weniger O<sub>2</sub> verbrauchenden NF-Arealen findet sich das Myoglobin um 23,3 % vermindert exprimiert. Wie in Kap. 1.3.1 dargestellt, konnten Flögel et al. 2001 erstmals die Beteiligung des Häm-Proteins auch an der Inaktivierung von NO (MbO<sub>2</sub> reagiert dabei mit NO zu metMb und NO<sup>3-</sup>) (56) beschreiben. In wie weit dies nun in Einklang mit der in NF-Gebieten durch verminderte NOS-Inhibition möglicherweise gesteigerten NO-Bildung (Kap. 4.1.2) gebracht werden kann, verbleibt hier jedoch spekulativ.

Setzt man trotz widersprüchlicher Erkenntnislage (139) eine weitere Funktion des Myoglobins als direkter Verstärker der oxidativen Phosphorylierung (genauer Mechanismus unbekannt) (40, 81) voraus, wäre dies ebenfalls ein Urheber für reduzierten O<sub>2</sub>-Verbrauch in NF- und diesbezüglich gegensätzliche (mit einer vermehrten β-Oxidation gut zu vereinbarende) Verhältnisse in HF-Proben.

Nicht zuletzt wird dem Myoglobin in teilweise desoxygeniertem Zustand eine die O<sub>2</sub>-Diffusion zwischen Sarkolemm und Mitochondrien erleichternde O<sub>2</sub>-Transporterfunktion („Facilitated Oxygen Diffusion“) (139, 198) - als Übersichtsartikel: (224) - zugeschrieben, deren genaue Bedeutung vor allem *in vivo* allerdings noch nicht abschließend geklärt ist (25, 97). Eine solche Wirkung schließlich könnte die durch einen vermehrten O<sub>2</sub>-Bedarf gekennzeichnete und in HF-Arealen größer vermutete β-Oxidationskapazität zusätzlich unterstützen.

Im Gegensatz zu anderen myofibrillären Proteinen wie dem Tropomyosin und Myosin (MLC 1 und 2) zeigte lediglich das Desmin eine deutlich unterschiedliche Expression beim Vergleich NF/HF. Auf den 2D-PAGE-Gelen war es jeweils durch drei benachbarte Proteinspots (Positionen: M<sub>r</sub>'s etwa alle bei 52 kDa/IEP's zwischen pH 5,2 und pH 5,5; Abb. 3.5, Seite 54, Markierung 134/135) vertreten,

von denen alle in HF-Gebieten eine stärkere Intensität aufwiesen, aber nur zwei darüber hinaus auch signifikant waren (+50,7 %; +34,3 %).

Desmin ist ein muskelspezifisches Intermediärfilament, welches ähnlich dem Vimentin um die myozellulären Z-Scheiben gruppiert ist und angrenzende Myofibrillen an diese verankert (77). Seine Abwesenheit z. B. in desmindefizienten Mäusen ist u. a. mit strukturellen myokardialen Erkrankungen wie der dilatativen Kardiomyopathie assoziiert (57, 61) und führt, wie jüngst in einer anderen Proteomanalyse gezeigt, zu vielfältigen Änderungen von Proteinen des Stoffwechsels, der Apoptosesteuerung, der Signaltransduktion, etc (57). Insbesondere scheint auch eine (wohl in die Kontrolle der Permeabilität von ADP durch Poren der äußeren mitochondrialen Membran involvierte) Funktion zur effektiven Koordination der oxidativen Phosphorylierung von Bedeutung zu sein (102, 141). Auf diese Weise könnte Desmin in den HF-Arealen größere mechanische Stabilität garantieren und evtl. gleichzeitig am erhöhten Energieumsatz mitbeteiligt sein.

### **4.1.5 Morphologische Untersuchung**

In Übereinstimmung mit der vergleichbaren Expression eines Großteils aller untersuchten Proteine (die Markerproteine [NF ≈ HF] sind einleitend beschrieben und in Tab. 3.1 aufgelistet) fanden sich nach morphometrischer Auswertung der EM- sowie LM-Aufnahmen keine erwähnenswerten Unterschiede zwischen NF- und HF-Proben bezüglich der kapillaren und mitochondrialen Volumenanteile am Herzgewebe.

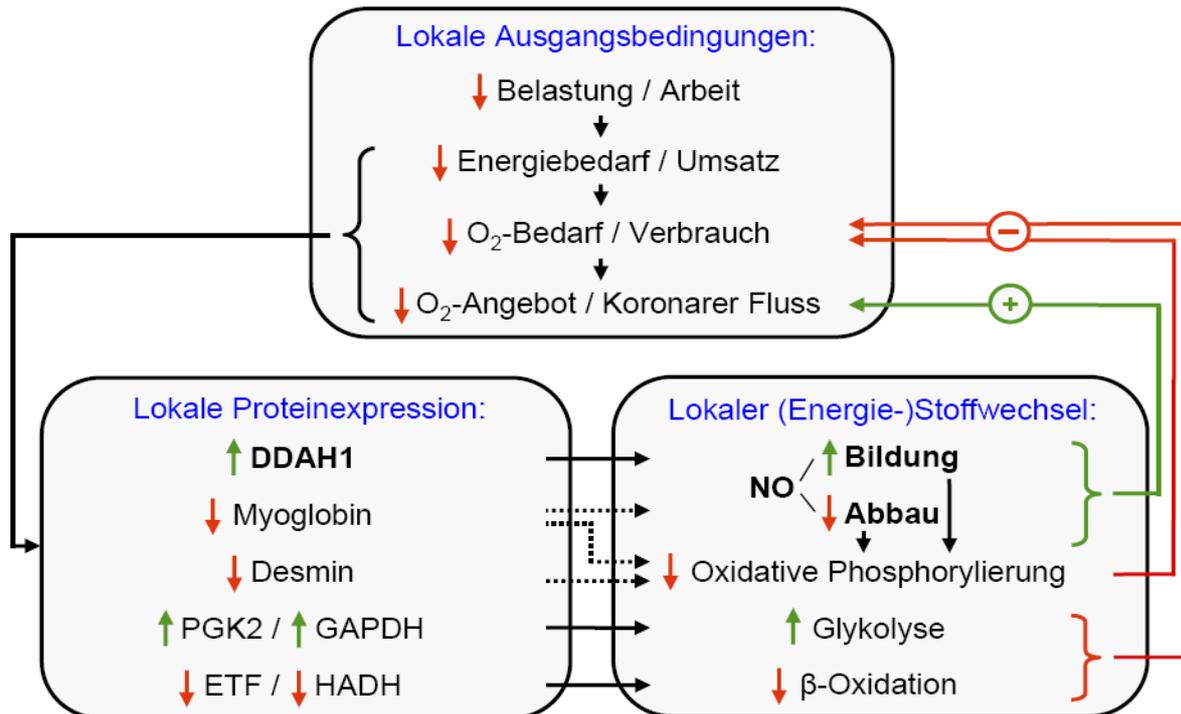
Da die für die Perfusions-Messung relevante Mikrosphärengabe hier am wachen Tier erfolgte, zeigen diese Befunde erstmals zweifelsfrei, dass sich NF- und HF-Areale hinsichtlich ihrer Morphologie nicht unterscheiden. Sie bestätigen damit zwar auch die Ergebnisse einer früheren Untersuchung (194), in dieser war die Flussfassung allerdings erst nach Thorakotomie und Perikardiotomie erfolgt. Mittlerweile ist bekannt, dass dies die Flussverteilung beeinflussen kann (Kap. 1.2.2) (95). Folglich musste die Validität der früheren Untersuchung in Frage gestellt werden. Die auf sie zurückgehende, grundlegende Annahme der morphologischen Äquivalenz von NF- und HF-Arealen hat bezüglich der hier untersuchten Kriterien nun aber dennoch Bestand.

### 4.1.6 Folgeuntersuchung

In einer dieser Arbeit nachfolgend durchgeführten Untersuchung zur Genexpression von Ionenkanälen mittels quantitativer PCR-Messung konnte eine etwa 3-fache Erhöhung ( $n=6$ ;  $P < 0,001$ ) des ERG-Kaliumkanals (urspr. Dog ERG von „Drosophila Melanogaster Ether-a-go-go Related Gene Potassium Channel“; hier: für die schnelle/rapide Komponente des verzögerten  $K^+$ -Gleichrichterstromes  $I_{K,r}$  u. a. zuständige  $\alpha$ -Kanaluntereinheit) in NF-Arealen nachgewiesen werden (196). Dies ist neben der bereits beschriebenen (Kap. 4.1.2), vermutlich NO-vermittelten Verkürzung des Aktionspotentialplateaus durch Steigerung des  $I_{K,s}$  (langsame Komponente des verzögerten  $K^+$ -Gleichrichterstromes) (5, 6) ein zusätzlicher interessanter Aspekt der intrazellulären  $K^+$ -Milieusteuerung. Auch dieses Ergebnis ist konsistent mit der vermuteten, den Energie- und  $O_2$ -Verbrauch senkenden Reduktion myokardialer Kontraktilität in NF-Gebieten.

### 4.1.7 Schlussbetrachtung

In dieser Arbeit wurde zum ersten Male das molekulare Korrelat der räumlichen Heterogenität von myokardialer Durchblutung und Metabolismus charakterisiert. Die Ergebnisse weisen im Wesentlichen auf grundlegende Unterschiede des NO-Stoffwechsels sowie der Substratverwertung zwischen Herzarealen mit dauerhaft niedrigem resp. hohem Blutfluss und Energieumsatz hin. Hinter den Veränderungen ist dabei ein homöostatischer Regelkreislauf zu vermuten, der  $O_2$ -Angebot sowie -Nachfrage kontrolliert und auf diese Weise die mit weniger als 50 % des durchschnittlichen myokardialen Blutflusses versorgten NF-Areale vor ischämischen  $O_2$ -Mangel schützt. Gemäß Abb. 4.3 würde in diesen Gebieten demnach einerseits die u. a. wegen gesteigerter Hydrolyse des NOS-Inhibitors ADMA (durch vermehrte DDAH1) erhöhte NO-Bildung mittels gegensteuernder koronarer Vasodilatation einer zu geringen Durchblutung entgegenwirken (eine der Wirkungen; Weiteres: Abb. 4.3), während andererseits der Stoffwechselshift von  $\beta$ -Oxidation in Richtung Glykolyse einen gleichzeitig verringerten  $O_2$ -Verbrauch zur Folge hätte (einer der Gründe; Weiteres: Abb. 4.3). Die Annahme einer für NF-Areale protektiven Kopplung bzw. Anpassung des Metabolismus an den Blutfluss steht nicht zuletzt auch in Einklang mit der Beobachtung von in diesen Gebieten unter Ruhebedingungen genauso wenig erhöhten Ischämieparametern



**Abb. 4.3 Möglicher Regelkreis von O<sub>2</sub>-Angebot und -Nachfrage in NF-Arealen modifiziert nach (117).** Die O<sub>2</sub>-Homöostase wird über einen rückkoppelnden Einfluss des durch die unterschiedliche lokale Proteinexpression an die NF-Bedingungen adaptierten (Energie-)Stoffwechsels verwirklicht. ↓ = Verminderung. ↑ = Zunahme. → = führt zu (→ Ursache und Folge vermehrt spekulativ). Vgl. auch Abb. 4.5.

Adenosin (20, 125, 194) und Laktat (20, 34, 125). Bei im Rahmen dieser Untersuchungen ebenfalls durchgeführten Koronarstenoseexperimenten wiesen die Ischämieparameter darüber hinaus einen (ab 50 % Perfusionsminderung beginnenden) vergleichbaren Anstieg in NF- und HF-Proben auf. Es scheint sogar, dass ein gesteigerter ATP-Bedarf in den HF-Arealen diese im Falle einer Sauerstoffminderversorgung anfälliger für Infarktereignisse macht (66).

Der genaue, den lokalen myokardialen Blutfluss und Energiebedarf bestimmende Faktor(enkomplex) ist zur Zeit nicht bekannt (7). Vor dem Hintergrund einer hochstabilen räumlichen Heterogenität erscheint es jedoch plausibel, dass konstante äußere Faktoren in Zusammenhang mit etwa der myokardialen Faserarchitektur sowie den lokal unterschiedlichen Belastungen via Energiebedarf/-umsatz und daraus resultierendem O<sub>2</sub>-Bedarf/-Verbrauch den Blutfluss modulieren. Die unterschiedliche Gen- und Proteinexpression wiederum ist in diesem Rahmen als eine Anpassung an die lokal verschiedenen Anforderungen/Bedürfnisse zu verstehen (Abb. 4.3).

## 4.2 Myoglobindefizienz

Bei den 1999 von Gödecke et al. (71) beschriebenen fertilen, mit Wildtyptieren vergleichbar leistungsfähigen sowie phänotypisch weitgehend unauffälligen Myoglobin-Knockout-Mäusen waren im Vorfeld bereits Kompensationsmechanismen gefunden worden, die u. a. den  $P_{O_2}$ -Gradienten in Richtung der Muskelzellmitochondrien steigern (71). Bei dieser Untersuchung konnten nun auch auf Ebene der Proteinexpression Adaptationen an die Myoglobindefizienz nachgewiesen werden (21 signifikante von  $461 \pm 22$  Proteinen beim Vergleich von 12 WT- mit 12 Myo<sup>-/-</sup>-Mäusen in Zweifachbestimmung). Wesentliches Ergebnis ist dabei eine deutliche Verringerung der  $\beta$ -Oxidations-, begleitet von einer wahrscheinlichen Steigerung der Glykolysekapazität in den Myo<sup>-/-</sup>-Herzen. Da die Glykolyse weniger  $O_2$  pro Mol produziertem ATP benötigt spricht dieser Befund vermutlich für eine den  $O_2$  effektiver nutzende ATP-Bildung und - zusammen mit einer weiteren Änderung - auch für eine Nachahmung der Eigenschaften von weißen (schnellen) Muskelfasertypen seitens der Myokardfasern. Schließlich lässt die ebenfalls in den Myo<sup>-/-</sup>-Proben feststellbare Expressionszunahme eines Vertreters der HSP70-Hitzeschockproteinfamilie auch über eine (u. a. die Funktion des Myoglobins als Radikalbeseitiger untermauernde) Stressreaktion des Herzgewebes spekulieren.

In den sich anschließenden Unterkapiteln werden die hier beschriebenen Zusammenhänge genauer ausgeführt. Kap. 4.2.1 skizziert aber zunächst für die weitere Diskussion relevante Ergebnisse, welche in auf den Daten dieser Arbeit aufbauenden Untersuchungen (55) ermittelt wurden.

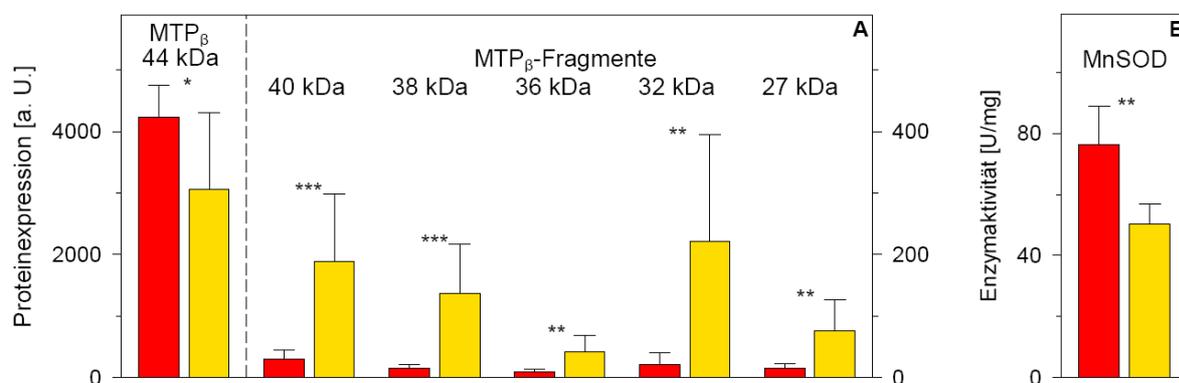
### 4.2.1 Weiterführende Experimente

Im Falle der Untersuchung zur Myoglobindefizienz ließ sich anhand der zwei folgend skizzierten Experimente (55) die funktionelle Relevanz der bisher erhobenen Daten untermauern:

Die vier gemäß Proteomanalyse nahezu ausschließlich in den Myo<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen auffindbaren Fragmente der  $\alpha$ -Untereinheit des Mitochondrialen Trifunktionalen Proteins (MTP;  $\alpha_4\beta_4$ -Heterooktamer mit den drei für langkettige Fettsäuren

spezifischen Enzymaktivitäten Enoyl-CoA-Hydratase, Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Ketoacyl-CoA-Thiolase; Näheres: Kap. 3.3 und Kap. 4.2.2) (204) legen dort einen verringerten Gehalt intakter Proteinkomplexe nahe. Unter Zuhilfenahme eines freundlicherweise von Arnold Strauss (91) zur Verfügung gestellten polyklonalen Antikörpers des Kaninchens gegen die  $\beta$ -Untereinheit des murinen MTP's ( $MTP_{\beta}$ ) wurden die Herzen von  $n=9$   $Myo^{-/-}$  und  $n=9$  WT-Tieren in Einzelbestimmung per Western-Blot dahingehend weiter untersucht. Diagramm A aus Abb. 4.4 listet die Ergebnisse auf. Das intakte  $MTP_{\beta}$  war in den  $Myo^{-/-}$ -Proben durchschnittlich um 27,6 % reduziert. Im Gegenzug lassen sich vornehmlich dort gleich fünf Fragmente auch der  $\beta$ -Untereinheit detektieren.

Um zu prüfen, ob sich die durchschnittlich 68,6 %ige Expressionsminderung der Mangan-Superoxid-Dismutase in den  $Myo^{-/-}$ -Proben (signifikanteste Veränderung gemäß SAM und im unverbundenen t-Test; vgl. Kap. 3.3) auch auf Ebene der Enzymaktivität widerspiegelt, erfolgte nach Vorbereitung der Proben gemäß eines an Mela et al. (137) angelehnten Protokolls einmal an  $n=5$   $Myo^{-/-}$  und  $n=5$  WT-Herzen eine entsprechende von Crapo et al. (29) beschriebene Messung. In WT-Herzen war die MnSOD-Aktivität dabei im Durchschnitt um 52 % höher als in  $Myo^{-/-}$ -Herzen ( $76 \pm 12$  U/mg zu  $50 \pm 7$  U/mg; Diagramm B aus Abb. 4.4).



**Abb. 4.4 Ergebnisse der weiterführenden Experimente im Überblick.** Balken links der gestrichelten Linien beziehen sich auf die linken Ordinaten und vice versa. WT-Proben = rot,  $Myo^{-/-}$ -Proben = gelb. Anzahl der Mäuseherzen von links nach rechts: je  $n=9$  / je  $n=5$ . \* = signifikant ( $P < 0,05$ ), \*\* = sehr signifikant ( $P < 0,01$ ) und \*\*\* = hoch signifikant ( $P < 0,001$ ) im unverbundenen t-Test. a. U. = willkürliche Einheiten

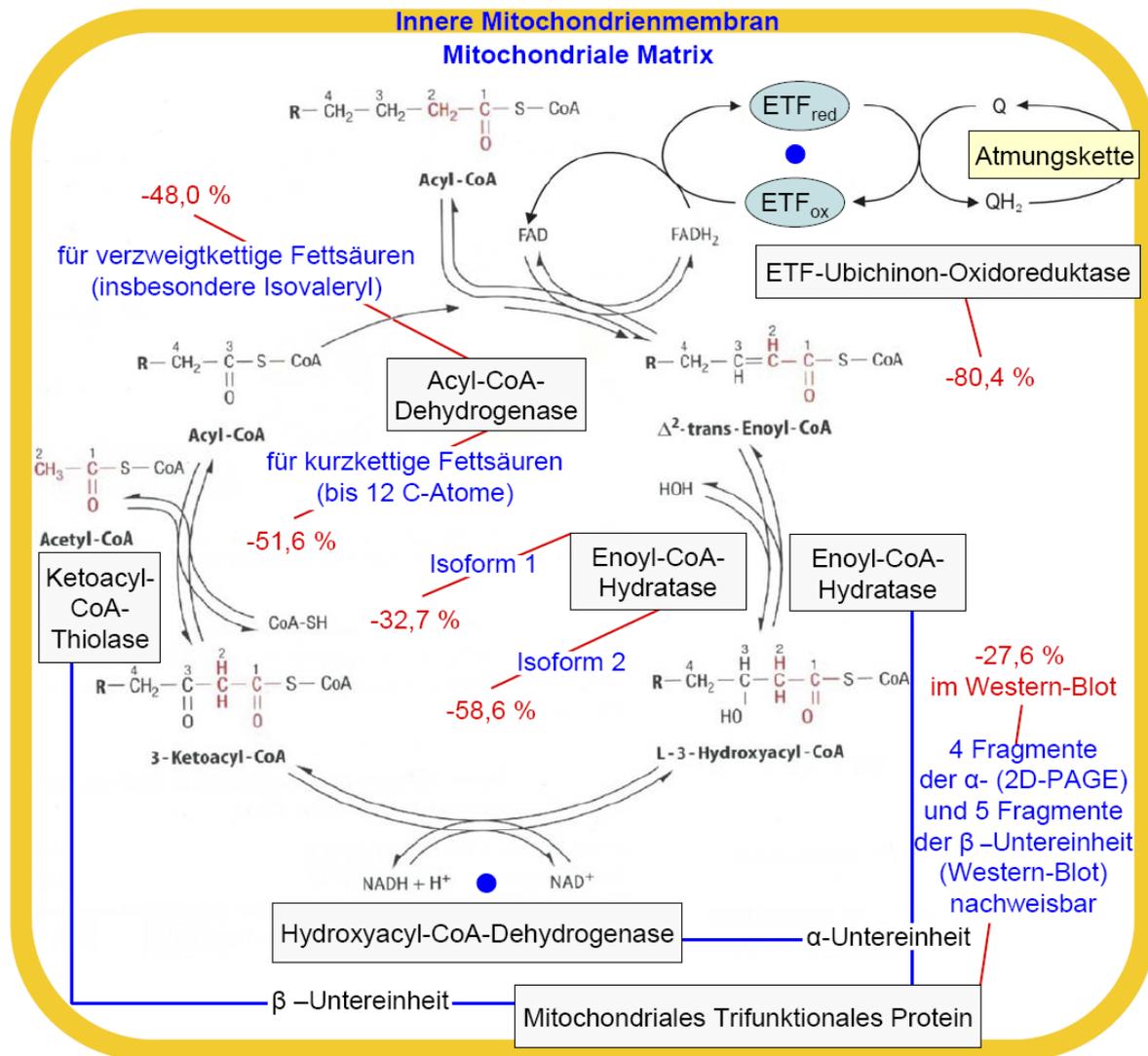
In der sich nun anschließenden Diskussion der eigenen Ergebnisse wird innerhalb einzelner Unterkapitel erneut Bezug auf die hier skizzierten Ergebnisse genommen.

#### 4.2.2 Fettstoffwechsel und Glykolyse

10 der 21 im Mäuseexperiment signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine sind dem Fettstoffwechsel und davon 9 der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation zuzurechnen (Abb. 4.5).

5 der Proteine wurden in den *Myo*<sup>-/-</sup>-Herzen direkt als vermindert exprimiert identifiziert (Abb. 4.5), während sich die Abnahme des Mitochondrialen Trifunktionalen Proteins indirekt anhand des erhöhten Gehaltes von 4 Fragmenten seiner  $\alpha$ -Untereinheit ( $MTP_{\alpha}$ ) andeutete. Die Annahme einer verminderten MTP-Expression konnte schließlich im Western-Blot mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen die  $\beta$ -Untereinheit ( $MTP_{\beta}$ ) weiter gestützt werden, wobei auch hier 5 (gleichfalls vornehmlich in den *Myo*<sup>-/-</sup>-Proben vorhandene) Fragmente gefunden wurden (Abb. 4.4). In Kombination mit der ebenfalls hauptsächlich im *Myo*<sup>-/-</sup> festzustellenden  $\alpha$ -Untereinheit-Fragmentierung und angesichts der Tatsache, dass gerade ein Verlassen der intakten  $\alpha_4\beta_4$ -Heterooktamerstruktur des MTP's mit einem Stabilitätsverlust der einzelnen Untereinheiten einhergeht (159, 206, 219), stützt dieses Ergebnis die Hypothese einer Herunterregulierung des kompletten Enzymkomplexes bei den Knockout-Tieren. Die im *Myo*<sup>-/-</sup> vermehrt festzustellende Fragmentierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten wäre demnach die Folge einer Destabilisierung dieser Untereinheiten durch „regulierte“ Auflösung der MTP-Heterooktamerstrukturen.

Neben der global verminderten Kapazität für die  $\beta$ -Oxidation war bezüglich des Fettstoffwechsels auch die Abnahme des Apolipoproteins A-1 signifikant (-72,5 %). Es ist Bestandteil u. a. der „High Density Lipoproteine“ (HDL) sowie Chylomikronen und dabei als Aktivator der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) in den Serumlipidtransport involviert (124). Da die Herzen vor der 2D-PAGE blut-frei perfundiert wurden, bezieht sich dieses Ergebnis auf intrazelluläre, interstitielle oder endothelialständige Varianten.



**Abb. 4.5 Mechanismen zur Reduktion der  $\beta$ -Oxidation in  $Myo^{-/-}$ -Herzen.** Sämtliche in der 2D-Page und dem Western-Blot signifikant vermindert exprimierte Enzyme sind aufgeführt. Die Enoyl-CoA-Hydratase ist als Bestandteil der  $\alpha$ -Untereinheit des membrangebundenen [IMM] MTP's und mit zwei ihrer im inneren Chondrioplasma löslichen Isoformen doppelt dargestellt. Q = Ubichinon. QH<sub>2</sub> = Ubichinol. R = Restgruppe. [● = in NF-Arealen des Hundexperimentes signifikant vermindert exprimierte Proteine der  $\beta$ -Oxidation].

Der Verminderung/Änderung von  $\beta$ -Oxidation und Serumlipidtransport steht auf der anderen Seite eine deutliche Erhöhung des zytosolischen Glykolysenzylms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; +423,5 %) gegenüber. Wie schon beim Vergleich von geringer perfundierten NF- mit stärker perfundierten HF-Arealen im Hundexperiment (Kap. 4.1.3) (117) legt dies eine Abnahme der Fettsäure- zu Gunsten der Glukoseoxidation im Energiestoffwechsel der  $Myo^{-/-}$ -Herzen nahe. Ein ähnlicher Stoffwechselshift wurde auch schon bei anderen Proteomanalysen in Zusammenhang mit dilatativer Kardiomyopathie und induzierter Herzinsuffizienz beschrieben (87, 152, 217, 218). Die Umstellung ist,

wie bereits dargelegt, aus energetischer Sicht von Vorteil, da Glukose im Rahmen ihrer Oxidation weniger O<sub>2</sub> pro Mol produziertem ATP benötigt (125) (zur Veranschaulichung siehe Diskussion in Kap. 4.1.3). Auch weiße (schnelle) Muskelfasern nutzen ihr im Vergleich zu den roten (ausdauernden) Fasern geringeres O<sub>2</sub>-Angebot mittels einer vermehrt auf Glykolyse abgestimmten Enzymausstattung effektiver (8).

Der eine effektive O<sub>2</sub>-Nutzung garantierende Stoffwechselshift  $\beta$ -Oxidation  $\rightarrow$  Glykolyse ist demnach ein verbreiteter Adaptationsmechanismus von bezüglich des O<sub>2</sub>-Angebots restringierten Geweben. In den Myo<sup>-/-</sup>-Herzen scheint er ein wesentlicher Bestandteil der Kompensation des Myoglobinverlustes zu sein, was gleichfalls die bedeutende Rolle des Mb's für die O<sub>2</sub>-Versorgung unter Normalbedingungen hervorhebt.

#### 4.2.3 Antioxidativer Stoffwechsel

Die 3 Proteinexpressionsänderungen im antioxidativen Stoffwechsel mit der höchsten Signifikanz betreffen die 2 Enzyme Non-Selenium Glutathion-Peroxidase (NSGPx; u. a. auch: Peroxiredoxin 6) und Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD).

Die zweimalige Erfassung der zytosolischen NSGPx als Spot 343 im WT und Spot 908 im Myo<sup>-/-</sup> beruht allerdings nicht auf einer Änderung der Proteinmenge, sondern einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes (IEP) von pH 6,42 (WT) nach pH 6,05 (Myo<sup>-/-</sup>). Bei der im Folgenden veranlassten cDNA-Sequenzanalyse fand sich als Erklärung eine bereits beschriebene (145) vermeintliche Spleißvariante, wobei an Position 123 der Myo<sup>-/-</sup>-Variante des Enzyms Alanin durch Aspartat ersetzt ist (berechnete IEP's: pH 5,98 im WT; pH 5,71 im Myo<sup>-/-</sup>). Ursachen und Folgen der Mutation verblieben jedoch unklar. Aufschlussreich wäre unter Umständen eine Messung der Enzymaktivitäten beider Varianten in zukünftigen Untersuchungen.

Die größte Signifikanz (SAM und unverbundener t-Test) weist die im Myo<sup>-/-</sup> vermindert exprimierte mitochondriale MnSOD (-68,6 %) auf. Dem entspricht auch eine Abnahme der Enzymaktivität um 34,2 % (Abb. 4.4). Die MnSOD wird als

eines von 15 Proteinen (122) in ihrer Expression durch das „Superoxide-Regulon“ *soxRS* („Superoxid Response“) (122) moduliert und entfernt hauptsächlich zum Schutze der Atmungskettenproteine die größtenteils von eben diesen gebildeten  $O_2^-$ -Radikale unter Bildung von  $H_2O_2$ , welches letztlich Katalase-vermittelt zu  $H_2O$  und  $O_2$  weiterreagiert (156) – als Übersichtsartikel: (59, 60). Obwohl mit dem Wegfall des  $O_2$ -Speichers Mb in *Myo<sup>-/-</sup>*-Herzen auch ein in die Entfernung reaktiver  $O_2$ -Spezies involviertes Protein (53, 54, 56) – als Übersichtsartikel: (158) – entbehrt wird, ist eine Herunterregulierung der MnSOD aufgrund des gleichfalls erniedrigten  $O_2$ -Angebots dennoch nicht ungewöhnlich. Schon in früheren Experimenten konnte eine hypoxiebedingt verminderte Expression der MnSOD auf mRNA- (94, 156) und auch Proteinexpressionsebene (179) gezeigt werden. Im Gegenzug führte eine Hyperoxie entsprechend zu einer Steigerung der MnSOD-Konzentration (213). Die MnSOD-Expressionsminderung im *Myo<sup>-/-</sup>* wäre demnach eine *soxRS*-modulierte Adaptation an das im Zuge des Myoglobinverlustes erniedrigte myokardiale  $O_2$ -Angebot (auch: Kap. 4.2.4).

Die 2 Stressproteine  $\alpha$ -Krystallin (B-Kette; auch:  $\alpha$ B-Krystallin) sowie Mitochondriales Stress-70-Protein (u. a. auch: HSP74, PBP74, Mortalin, Grp75) zählen beide zu den Hitzeschockproteinen (HSP), fungieren u. a. wohl als zytoprotektive, die korrekte native Faltung von Proteinen beschleunigende Chaperone und waren in der Untersuchung beide signifikant verändert.

Das kleine HSP  $\alpha$ B-Krystallin (109, 162) ist im *Myo<sup>-/-</sup>* um 38,4 % vermindert, was nicht konsistent mit einer auf Myoglobindefizienz beruhenden Stressreaktion und den Ergebnissen einer die ischämieprotektive Wirkung dieses HSP's beschreibenden Studie (134) erscheint. Allerdings ist  $\alpha$ B-Krystallin typischerweise vermehrt in den sich durch hohe oxidative Kapazität auszeichnenden Muskelfasern vorhanden (150) (etc). Neuffer et al. konnten 1996 zeigen, dass eine durch Motoneuronenstimulation in Skelettmuskeln (*Musculus tibialis anterior*) induzierte Vermehrung des Gehalts an roten (ausdauernden) Muskelfasern gleichzeitig mit einem 4-fachen Anstieg des  $\alpha$ B-Krystallins einhergeht (150). *Myo<sup>-/-</sup>*-Herzen scheinen demnach nicht nur in puncto Substratverstoffwechslung (Kap. 4.2.2), sondern auch bezüglich des Gehalts an  $\alpha$ B-Krystallin die Eigenschaften weißer Muskelfasern nachzuahmen – ein Aspekt, der nicht zuletzt

auch in Einklang mit den Ergebnissen der bereits erwähnten Studie von Grange et al. (76) steht.

Das große HSP Mitochondriales Stress-70-Protein bzw. HSP74 (30, 216) hingegen findet sich im Myo<sup>-/-</sup> um 162,1 % erhöht. Als (nicht typisches) (216) Mitglied der auch ischämie reagiblen (115) HSP70-Stressproteinfamilie ist es u. a. an der Modulation des noch zu diskutierenden (Kap. 4.2.4) Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Proteins 1 (VDAC 1) beteiligt (188), vor allem aber als Marker für eine auf dem Myoglobinmangel beruhende, spezifische Stressreaktion zu verstehen.

#### 4.2.4 Sonstige Änderungen im Proteinexpressionsmuster

2 andere Proteine, das Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1 (VDAC; -60,2 %) und die Fumarat-Hydratase (-35,9 %), fanden sich im Myo<sup>-/-</sup> signifikant vermindert exprimiert.

Das VDAC 1 fungiert u. a. im Energiestoffwechsel als Transporter für ATP (Efflux), ADP (Influx) und weitere Metabolite durch die äußere Mitochondrienmembran (2, 75, 176, 177) - als Übersichtsartikel: (15, 31). In dieser als Membranprotein auch Einfluss auf das (Ca<sup>2+</sup>-)Ionenmilieu ausübenden Funktion wird ihm ebenfalls eine (evtl. auch im Rahmen von Reaktionen auf oxidativen Stress) die Apoptose modulierende Rolle zugeschrieben (31, 75). Gerade vor diesem Hintergrund ist gleichfalls die in Kap. 4.2.3 diskutierte Erhöhung des Mitochondrialen Stress-70-Proteins (u. a. auch: PBP74) (30, 216) in Myo<sup>-/-</sup>-Proben von Interesse, da PBP74 die Spannungsabhängigkeit des VDAC's drastisch zu reduzieren vermag (188) und somit als Stressprotein unter Umständen an der Steuerung apoptotischer Signalwege mitbeteiligt ist.

Die Erniedrigung der löslichen, im Citratzyklus die Umwandlung von Fumarat zu Malat katalysierenden Fumarat-Hydratase ist evtl. auf die gemeinsame Expressionssteuerung dieses Enzyms mit der ebenfalls in Kap. 4.2.3. diskutierten Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) durch das „Superoxid-Regulon“ soxRS („Superoxide Response“) (122, 123) zurückzuführen. Letztlich würde dies mittelbar

die Annahme einer *soxRS*-modulierten Repression der MnSOD in Folge des myoglobinmangelbedingt erniedrigten myokardialen O<sub>2</sub>-Angebots stützen.

3 noch verbleibende signifikante Steigerungen der Proteinexpression im *Myo*<sup>-/-</sup> beziehen sich schließlich auf die durch zwei Peptidsequenzen vertretene  $\alpha$ -Kette der mitochondrialen ATP-Synthase (+766,7 %; +98,9 %) und ein Fragment des myokardialen Strukturproteins Myosin (schwere Kette,  $\alpha$ -Isoform; +214,1 %). Spekulativ ließen sich diese Veränderungen den in *Myo*<sup>-/-</sup>-Herzen unter Umständen vermehrt stattfindenden degenerativen Prozessen zuordnen, was aber vor dem Hintergrund der in beiden Fällen großen Mengen an jeweils intaktem Protein von wahrscheinlich untergeordneter Bedeutung wäre.

### 4.2.5 Folgeuntersuchungen

In einer dieser Arbeit nachfolgenden Studie (55) wurde der in den *Myo*<sup>-/-</sup>-Herzen beobachtete Stoffwechselshift  $\beta$ -Oxidation  $\rightarrow$  Glykolyse (Kap. 4.1.3) weitergehend untersucht. Mittels hochauflösender <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie erfolgte dabei u. a. eine *in vitro*-Isotopomerenanalyse (130) von Glukose- und Palmitatverwertung sowie eine *in vivo*-FDG-PET-Messung der myokardialen Glukoseaufnahme. Hierbei zeigte sich ein Substratnutzungsratio Palmitat/Glukose von 2,9 zu 1 in WT- und 1,1 zu 1 in *Myo*<sup>-/-</sup>-Proben (WT: 63  $\pm$  11 %/22  $\pm$  5 %; *Myo*<sup>-/-</sup>: 42  $\pm$  6 %/38  $\pm$  8 %; je n=6; P < 0,05). Der Glukose-Uptake bezogen auf die injizierte Dosis war in Einklang damit im *Myo*<sup>-/-</sup> um 737,5 % höher als im WT (WT: 0,8  $\pm$  0,5 %; *Myo*<sup>-/-</sup>: 6,7  $\pm$  2,3 %; je n=5; P < 0,001). Beide Resultate zeigen eindrücklich die funktionelle Relevanz der in Proteomanalyse und verifizierendem Western-Blot erhobenen Befunde.

In einer weiteren Proteomanalyse mit den selben WT- und *Myo*<sup>-/-</sup>-Mäusestämmen (je n=5 Tiere) wurden die Veränderungen der Proteinexpressionsmuster auch unter hypoxischen Bedingungen (10 % O<sub>2</sub> für 2 Wochen) untersucht (183). Neben den in der vorliegenden Arbeit bereits gefundenen Änderungen wurde dabei im *Myo*<sup>-/-</sup> unter Hypoxie lediglich die Abnahme eines Precursors der schon als vermindert diskutierten (Kap. 4.2.2) Short-Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase (-54 %; P < 0,01), des herztypischen Fatty Acid Binding Proteins (H-FABP, erleichtert u. a

die Fettsäureaufnahme und transportiert intrazellulär Fettsäuren zu den Mitochondrien; -36 %,  $P < 0,01$ ) (69, 183) - als Übersichtsartikel: (187) - und des Heat Shock Proteins 27 (HSP27; -55 %;  $P < 0,05$ ) zusätzlich auffällig. Einzig die Verminderung des zytoprotektiven HSP27 (162) ist hierbei prima facie nicht konsistent mit den Ergebnissen der eigenen Proteomanalyse. Allerdings muss die aufgrund der HSP74-Steigerung angenommene myoglobinmangelinduzierte Stressreaktion (Kap. 4.2.3) nicht unbedingt auch mit einem vermehrt exprimierten HSP27 einhergehen. Schon in früheren, unterschiedlichste Stressreaktionen durch Arsen, Cadmium, Hitze oder Ischämie provozierenden Studien nicht nur am Herzen (105, 150, 175, 187) – lediglich als Abstract: (96) - wurde das Zusammenspiel von HSP27 mit z. B. verschiedenen Vertretern der HSP70-Familie (96, 105, 175) bzw. dem anderen in Kap. 4.2.3 diskutierten und mit HSP27 verwandten, kleinen HSP  $\alpha$ B-Krystallin (150, 162) als unterschiedlich beschrieben.

Dennoch steht zumindest die Studie von Grange et al. (hier wurde bei Myo<sup>-/-</sup>-Mäusen eines anderen Stammes mittels RT-PCR auf RNA-Ebene ein Anstieg des HSP27 gemessen) zu letzterem Ergebnis in einem Widerspruch, der sich aber auch auf unterschiedliches Verhalten von RNA- und Proteinexpression (Kap. 1.1.2) bzw. Eigentümlichkeiten innerhalb der verschiedenen Myo<sup>-/-</sup>-Mäusestämme (183) gründen könnte.

#### 4.2.6 Schlussbetrachtung

In dieser Arbeit wurden zum ersten Male die Anpassungen des Proteinexpressionsmusters an eine gentechnologisch in Mäusen hervorgerufene Myoglobindefizienz charakterisiert. Die Resultate geben dabei ein schlüssiges Bild: Das myoglobinmangelbedingte Missverhältnis von O<sub>2</sub>-Angebot und -Nachfrage führt im Energie bereitstellenden Stoffwechsel konsequent zu einer verringerten Kapazität der  $\beta$ -Oxidation bei gleichzeitig vermehrter Glykolyse. Dieser den O<sub>2</sub> effektiver nutzende (80, 113, 125, 197) Stoffwechselshift scheint in Geweben mit vergleichsweise stärker eingeschränktem O<sub>2</sub>-Angebot ein verbreiteter Adaptationsmechanismus zu sein, der u. a. auch bezüglich der räumlich und zeitlich stabilen Blutflussheterogenität in Hundeherzen (Kap. 4.1.3) (117) sowie im

Zuge des Vergleichs von roten (ausdauernden) mit weißen (schnellen) Muskelfasern (8) zu beobachten ist.

Die Eigenschaften weißer Muskelfasern werden von den Myo<sup>-/-</sup>-Herzmuskelfasern jedoch nicht nur die Substratverstoffwechslung betreffend, sondern auch in Bezug auf den in Myozyten mit geringerer oxidativer Kapazität verminderten (150)  $\alpha$ B-Krystallingehalt imitiert.

Schlussendlich deutet die ebenfalls in den Myo<sup>-/-</sup>-Proben gefundene Expressionszunahme eines Mitglieds der u. a. ischämie reagiblen (115) HSP70-Hitzeschockproteinfamilie eine spezifische, zytoprotektive Stressreaktion des Herzgewebes auf die Myoglobindingefizienz hin an.

Die in dieser Studie zusätzlich zu den bereits im Vorfeld bekannten, (lebens-)notwendigen Kompensationsmechanismen (Kap. 1.3.2) gefundenen Adaptationsstrategien von Mäusen an die Myoglobindingefizienz sprechen erneut für die bedeutende Rolle des Myoglobins u. a. als O<sub>2</sub>-Speicher- und Transportprotein. Besonders hervorzuheben ist die in mehreren Experimenten erstmalig aufgezeigte deutliche Modulation der myokardialen Substratselektion durch Myoglobin.

### 4.3 2D-PAGE-basierte Proteomanalyse

Die zweidimensionale Gelelektrophorese, auf welcher die hier beschriebenen Proteomanalysen basieren, ist das auch im Vergleich zu chromatographischen Ansätzen bisher meist verbreitete Verfahren (73, 128), welches einen Trennraum für Proteine mit mehreren 1000 Komponenten zur Verfügung stellt (in eukaryotischen Zellen sind allerdings zwischen  $10^6$ - $10^7$  Proteinspezies zu erwarten; Kap. 1.1.2). Besonderes Merkmal ist dabei, dass die Methode hochparallel funktioniert, d. h. es werden alle Proteine zur gleichen Zeit bearbeitet. Auch in der kardiovaskulären Forschung wurde sie bereits vielfach eingesetzt, u. a. zur Charakterisierung gesunden und erkrankten (i.e. dilatative Kardiomyopathien, Hypertrophie, induziertes Herzversagen, usw.) Herzgewebes (3, 26, 27, 86, 87, 152, 170, 182, 218) sowie zur Beschreibung von Proteinmusteralterationen nach Einwirkung von Alkohol (163), Blei (200), renovaskulärer Hypertension (169), etc. Trotz der unbestreitbaren Vorteile ist die Liste der nicht nur die vorliegende Arbeit betreffenden Limitationen umfangreich. Im Folgenden werden einige Probleme, welche bei dieser Untersuchung auftraten und Vorschläge zu deren Umgehung aufgezeigt.

Die Expression der eNOS war aufgrund ihrer grenzwertig großen Masse (im Falle der humanen eNOS [P294749] etwa 133,2 kDa bei einem IEP von 7,0 [Berechnung mit dem Expasy-Internettool; Kap. 3.2.1]) im oberen Bereich der Hundegele nicht hinreichend beurteilbar. Zumindest auf mRNA-Ebene ließen sich hier jedoch keine Unterschiede nachweisen (Kap. 4.1.1). Kleinere Proteine hingegen, wie die Cytochrom c-Oxidase, das Fatty Acid Binding Protein, etc. fanden sich in den unteren Gelbereichen oft verschwommen wieder. Auch andere potentiell signifikant veränderte Proteine außerhalb der methodisch vorgegebenen Massen- und pH-Bereiche konnten methodenbedingt nicht berücksichtigt werden. Ein Ausweg bezüglich der ersten Problematik ist die Verwendung anderer Gele mit auf die zu untersuchenden Proteinmassen abgestimmten Porengrößen (Kap. 1.1.3). Bei sehr kleinen Proteinen (1-100 kDa) eignet sich während der Elektrophorese zusätzlich ein Tricin- anstelle des Glycinpuffers (181). Die interessierenden pH-Wertbereiche wiederum lassen mit speziellen Immobilinen (IPG-Streifen) je nach Bedarf justieren. Für den stark alkalischen Bereich sind inzwischen „pH3-pH12-Versionen“ erhältlich (73, 74).

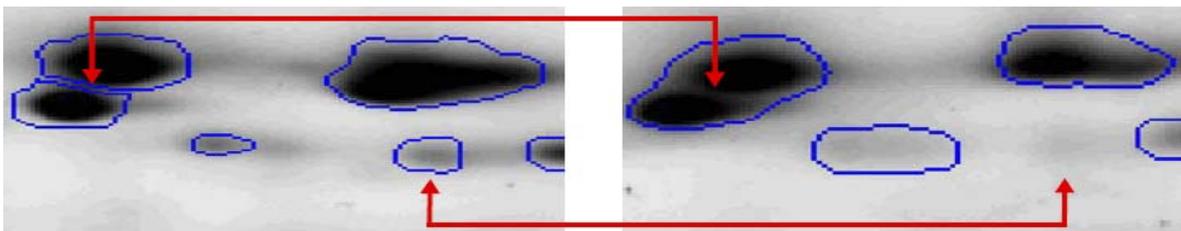
Auch die NEPHGE („Nonequilibrium-pH-Gel-Elektrophorese“) ist eine geeignete Methode für stark basische Proteine (pH 8,0-12,0) (184). Um bei speziellen Fragestellungen bessere Auflösungen zu erzielen oder extreme pH-Wertbereiche darzustellen, empfiehlt sich letztendlich auch die Verwendung freier Trägerampholyte anstelle kommerzieller IPG-Streifen (73, 112, 135, 184).

Eine weitere Limitation lässt sich anhand der Faktoren HIF 1 $\alpha$  und HIF 2 (Hypoxia-Inducible Transcription Factors) erläutern. Diese wurden bei einem anderen als dem hier untersuchten Myo<sup>-/-</sup>-Mäusestamm mittels RT-PCR als vermehrt exprimiert beschrieben und induzieren via Genaktivierung beispielsweise den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) (76, 136). Mittels der Proteomanalyse war keine solche Änderung nachweisbar. Abgesehen von einer Verschiedenartigkeit der Myo<sup>-/-</sup>-Mäusestämme (183) oder Unterschieden zwischen mRNA- und Proteinanalysen per se, mag dies an einer zu geringen Sensitivität der 2D-PAGE gelegen haben, welche bei der hier beschriebenen Vorgehensweise nur stärker vertretene Proteine mit einer Mindestanzahl von schätzungsweise 10.000 Kopien darstellt und somit die Detektion vieler Transkriptionsfaktoren nicht ermöglicht. Auch Proteinverluste beim Transfer der Proben von der ersten auf die zweite Dimension werden hier eine Rolle spielen. Andererseits wurden prominente Proteine wie das Aktin oder die Kreatinkinase häufig überfärbt dargestellt (Transparenzen bei zu starker Farbsättigung). Das Problem der zu geringen Sensitivität kann nur bis zu einem gewissen Grade durch z. B. das Bestücken der Gele mit einer größeren Gesamtproteinmengen, anderen Färbungen oder Anreicherung interessierender Proteine nach Probenfraktionierung (s. u.) umgangen werden. Der mangelnden dynamischen Breite ( $\hat{=}$  Mengenverhältnis darzustellender Proteine) wiederum lässt sich in Grenzen hauptsächlich durch andere Färbemethoden, insbesondere mit teuren Fluoreszenzfarbstoffen (dynamische Breite: 10<sup>3</sup>; Silber liegt im Vergleich dazu bei etwa 10<sup>2</sup>) (Kap. 1.1.3) (164) begegnen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass Fluoreszenzfarbstoffe kovalent an Proteine binden und so deren Position auf dem 2D-PAGE-Gel in beiden Dimensionen zu beeinflussen vermögen (73).

Es ist vorstellbar, dass auch wesentliche membrangebundene Proteine wie etwa an der Steuerung des intrakardiomyozytären Ionenmilieus beteiligte Rezeptoren

und Ionenkanäle trotz signifikanter Veränderungen nicht erfasst wurden. Trotz der Kompatibilität mit Detergenzien bestehen nämlich bei 2D-PAGE-Protokollen wie dem hier verwendeten noch immer große Schwierigkeiten bezüglich der Solubilisierung hydrophober/lipophiler Proteine (180). Diese Einschränkung kann im Grunde nur durch modifizierte Elektrophoreseprotokolle beantwortet werden. Der Einsatz von sauren Puffern und speziellen kationischen Seifen bei der isoelektrischen Fokussierung liefert ein Beispiel für einen solchen Versuch (184). Zusätzlich können derartige Protokolle auch Schlierenbildungen, wie sie bei manchen unserer Gele beispielsweise im Bereich des Aktins auftraten, mindern. Ist man zusätzlich an der Untersuchung membrangebundener Proteine einzelner Zellorganellen (z. B. Atmungskettenproteine der Mitochondrien) interessiert, bieten sich die schon erwähnten Fraktionierungsverfahren im Vorfeld der isoelektrischen Fokussierung (111) an (weitere Trennungsvorgänge unter Umgehung der 2D-PAGE in Kap. 4.4.3). Gleichfalls erhält man so eine dritte Information zu jedem Protein ( $\hat{=}$  3D-PAGE).

Die zeitaufwendige computergestützte Auswertung der gefärbten Gele stellt die letzte hier beschriebene Einschränkung der 2D-PAGE dar. Abb. 4.6 gibt ein Beispiel aus der vorliegenden Arbeit, welches die Probleme im Zuge der automatischen Spoterkennung verdeutlicht. Nicht korrekt erkannte Proteinspots konnten nicht „gematcht“ werden und waren so auch keiner vergleichenden Auswertung zugänglich (Kap. 2.1.5). Spoterkennung und „Matchen“ bedurften daher einer zeitaufwendigen Korrektur, was einen hohen Durchsatz an Gelen ungemein erschwerte.



**Abb. 4.6 Problematik der computergestützten Spoterkennung.** Bei der automatischen Spotmarkierung werden nicht selten u. a. nahe beieinander liegende Spots zusammen erfasst und schwache Proteine ignoriert (Pfeile).

Die Auswertung der Gele zu vereinfachen versuchen u. a. „Ein-Gel-Methoden“ wie die DIGE („Difference Gel Electrophoresis“). Hier werden die Proben noch vor der 2D-Page beispielsweise unterschiedlich fluoreszierend gefärbt und nomen est omen auf einem Gel gleichzeitig dargestellt (205). Dadurch soll die Fehlerquote zumindest des „Matchens“ deutlich reduziert werden. Im „Ausblick“ (Kap. 4.4.3) sind abschließend einige mögliche Zukunftsentwicklungen skizziert, welche mittelfristig ebenfalls Lösungen der hier geschilderten Limitationen darstellen könnten.

## 4.4 Ausblick

### 4.4.1 Heterogenität der myokardialen Durchblutung

In Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit in HF-Arealen als vermindert exprimiert beschriebenen Glykolyseenzyme PGK2 und GAPDH gibt es keine Übereinstimmung mit der bisherigen Datenlage (Kap. 4.1.3). Studien mit Isotopomeren nach dem Vorbild der in Kap. 4.2.5 erläuterten Untersuchungen sind weiterhin nötig, um genaueren Aufschluss über die zwischen beiden Arealtypen bestehenden Unterschiede in der Substratverwertung zu erhalten. Auch beispielsweise immunhistochemische Gewebedarstellungen mit Antikörpern gegen die DDAH1, die eNOS oder andere Proteine/Enzyme, welche aufgrund der 2D-PAGE-Limitationen (Kap. 4.3) einer Erfassung entgangen sind (z. B. Proteine, die in die elektromechanische Kopplung oder den elementaren Kontraktionszyklus involviert sind), könnten hier zusätzlich relevante Informationen liefern.

In der Blutflussheterogenitätsforschung könnten künftig die auch klinisch eingesetzten Techniken wie SPECT, PET und vor allem hochauflösendes MRI (7) eine größere Rolle spielen. Während eine hinreichende Validität der Mikrosphärenflussmessung nur für räumliche Auflösungen bis 200  $\mu\text{m}$  in größeren (10, 116) resp. 50  $\mu\text{m}$  in kleineren Tieren (11) angenommen werden kann und weiter darüber hinaus (2  $\mu\text{m}$ ) fraglich ist (32), zeigten Bauer et al. (13) bereits 2001 das mit MRI Gewebevolumina in einer Größenordnung von 0,029  $\mu\text{m}^3$  (dies entspricht im Myokard etwa dem Versorgungsgebiet einer Arteriole) (7) kontrastmittelunabhängig darstellbar sind. Auch mit der Gabe von  $\text{D}_2\text{O}$  (substituiert im Gewebe anteilig das signalgebende  $\text{H}_2\text{O}$ ) lässt sich die myokardiale Perfusion quantitativ und mit lokaler räumlicher Auflösung MRI-gestützt erfassen, sodass dieser Ansatz ebenfalls für Untersuchungen der Blutflussheterogenität geeignet erscheint (35). Mit verbesserten MRI-Verfahren ist darüber hinaus künftig eine qualitativ zufriedenstellende simultane Erfassung von lokalem Fluss und lokaler Kontraktion denkbar. Nicht zuletzt könnte unabhängig dieser MRI-basierten Entwicklungen auch die Etablierung zusätzlicher Blutflussmarker (z. B. gelabeltes Adenosin) (116) mittelfristig das Methodenspektrum der Heterogenitätsforschung erweitern.

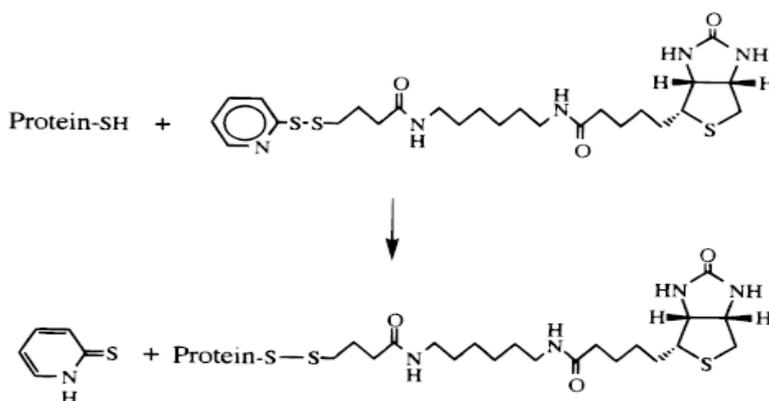
### 4.4.2 Myoglob indefizienz

Neben den gut nachvollziehbaren Ergebnissen, welche zu weitergehenden Nachforschungen Anlass geben (z. B. bezüglich der Existenz weiterer, nicht nur den Stoffwechsel und  $\alpha$ B-Krystallingehalt betreffenden Imitationen von Muskelfasertyp II-Eigenschaften seitens der Myokardfasern) (Kap. 4.2.2 und Kap. 4.2.3), führten die Resultate der vorliegenden Proteomanalyse auch zu mehreren spekulativen Interpretationen, die es noch zu hinterfragen gilt (z. B. bezüglich der Abnahme des u. a. in die Apoptosemodulation involvierten Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Proteins 1 [VDAC 1] in Kombination mit der Erhöhung des die VDAC-Spannungsabhängigkeit drastisch reduzieren Mitochondrialen Stress-70-Proteins) (Kap. 4.2.3 und Kap. 4.2.4). Auch die bei Betrachtung verschiedener Myo<sup>-/-</sup>-Mäusestämme auftretenden Studienergebnisunterschiede (z. B. bezüglich der im Myo<sup>-/-</sup> als erhöht exprimiert berichteten Faktoren HIF 1 $\alpha$  und HIF 2), welche wahrscheinlich mitunter auf 2D-PAGE-Limitationen (Kap. 4.3) beruhen, erfordern zusätzliche klärende Untersuchungen. Hier könnten ebenfalls u. a. Western-Blots, immunhistochemische Gewebedarstellungen und im Falle von als verändert beschriebenen Enzymen wie der Non-Selenium Glutathion-Peroxidase (NSGPx) Enzymaktivitätsassays zum Einsatz kommen.

Zwischenzeitlich ist in anderen Studien das Spektrum der dem Myoglobin zugeschriebenen Funktionen weiter charakterisiert worden. Erneut stellte sich dabei die protektive Bedeutung des Hämproteins in Bezug auf oxidative Schäden (53, 72, 131, 226) (hier: insbesondere infolge eines erhöhten NO-Gehaltes bei iNOS-Überexpression) (72, 226) sowie unter hypoxischen Konditionen (131) heraus. Auch in Zukunft werden wahrscheinlich vor allem die sich der genetischen Inaktivierung bedienenden Untersuchungen weitergehend zum Verständnis der Rolle des Myoglobins beitragen (62). Insbesondere zu klären sind die noch unzureichend beantworteten Fragen bezüglich der Mb-Expressionssteuerung als Reaktion auf akute/chronische hypoxische Stimuli, des Zusammenspiels von Mb-Induktion und muskulärer Aktivität sowie darüber hinaus der Einordnung des Mb's zusammen mit anderen erst kürzlich entdeckten Funktionsproteinen wie Neuroglobin oder Cytoglobin in eine erklärende „Systematik der Gewebehämoglobine“ (158).

### 4.4.3 Proteomanalytik

Der Notwendigkeit von Proteomanalysen (Kap. 1.1.2) stehen ein hoher methodischer Aufwand und zahlreiche Limitationen - insbesondere die 2D-PAGE betreffend (Kap. 4.3) – gegenüber. Die Weiterentwicklung der Automatisierung einzelner Arbeitsschritte – als Übersichtsartikel: (73, 126) – ist eine wesentliche Voraussetzung für ihre künftige Anwendung in größerem Stile. Andere Ansätze hingegen verfolgen die vollständige Umgehung der 2D-PAGE (142), so dass die Proteine nicht mehr aus einer nicht-inerten Matrix für Folgeanalysen entfernt werden müssen. Der Einsatz von Free-Flow-Elektrophoresen (215) oder der Massenspektrometrie unter Nutzung z. B. der Avidin-Biotin-Wechselwirkung (82, 185, 186) ist eine solche Möglichkeit. Mit der letztgenannten Methode können die Proteine in einem Schritt gereinigt und analysiert werden. Da in diesem Falle Proteine mit biotinylierbaren SH-Gruppen (Abb. 4.7) an den Avidinoberflächen selektiert werden, bietet diese Strategie gleichfalls auch weitere Auftrennungsmöglichkeiten für die Analyse komplexer Peptidgemische. Bringt man beispielsweise Deuterium bei einer der Proben in die Biotinmoleküle ein ( $\hat{=}$  ICAT [„Isotope-Coded Affinity Tag“]), so können äquivalente Probenproteine (die sich dann um genau definierte Massen unterscheiden) direkt via MALDI miteinander verglichen werden (82).



**Abb. 4.7 Biotinylierung von Proteinen.** Die an ihren SH-Gruppen mit unterschiedlichen Biotinabkömmlingen gelabelten Proteine werden in der Folge enzymatisch verdaut, mittels Avidin selektiert und schließlich massenspektrometrisch analysiert (186).

Als weitere zukunftssträchtige Wege der Proteomics schließlich gelten die gezielten Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels „Two Hybrid“-Analysen – als Übersichtsartikel: (190) (hefebasierte Systeme) und (118) (säugetierbasierte Systeme) – sowie die parallele Erfassung und Analyse möglichst vieler Peptide mittels der Protein-Biochips (151) (Übersichtsartikel), deren Effizienz durch die Nutzung von Plasmon-Resonanz-Techniken (233), Aptameren (108), direkte Kopplung an die massenspektrometrische Auswertung (SELDI) (220), etc. künftig noch weiter gesteigert werden könnte.

## 5 Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

1. Anderson, L. and Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 18: 533-537, **1997**.
2. Anflous, K.; Armstrong, D. D. and Craigen, W. J. Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J.Biol.Chem.* 276: 1954-1960, **2001**. @
3. Arnott, D.; O'Connell, K. L.; King, K. L. and Stults, J. T. An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. *Anal.Biochem.* 258: 1-18, **1998**.
4. Austin, R. E., Jr.; Aldea, G. S.; Coggins, D. L.; Flynn, A. E. and Hoffman, J. I. Profound spatial heterogeneity of coronary reserve. Discordance between patterns of resting and maximal myocardial blood flow. *Circ.Res.* 67: 319-331, **1990**.
5. Bai, C. X.; Namekata, I.; Kurokawa, J.; Tanaka, H.; Shigenobu, K. and Furukawa, T. Role of nitric oxide in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cardiac myocytes. *Circ.Res.* 96: 64-72, **2005**. @
6. Bai, C. X.; Takahashi, K.; Masumiya, H.; Sawanobori, T. and Furukawa, T. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current and the L-type Ca<sup>2+</sup> current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br.J.Pharmacol.* 142: 567-575, **2004**.
7. Balaban, R. S. and Arai, A. Function, metabolic, and flow heterogeneity of the heart: the view is getting better. *Circ.Res.* 88: 265-267, **2001**. @
8. Bass, A.; Brdiczka, D.; Eyer, P.; Hofer, S. and Pette, D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur.J.Biochem.* 10: 198-206, **1969**.
9. Bassingthwaighe, J. B.; King, R. B. and Roger, S. A. Fractal nature of regional myocardial blood flow heterogeneity. *Circ.Res.* 65: 578-590, **1989**.
10. Bassingthwaighe, J. B.; Malone, M. A.; Moffett, T. C.; King, R. B.; Chan, I. S.; Link, J. M. and Krohn, K. A. Molecular and particulate depositions for regional myocardial flows in sheep. *Circ.Res.* 66: 1328-1344, **1990**.
11. Bassingthwaighe, J. B.; Malone, M. A.; Moffett, T. C.; King, R. B.; Little, S. E.; Link, J. M. and Krohn, K. A. Validity of microsphere depositions for regional myocardial flows. *Am.J.Physiol.* 253: H184-H193, **1987**. @

12. Bassingthwaite, J. B.; van Beek, J. H. and King, R. B. Fractal branchings: the basis of myocardial flow heterogeneities? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 591: 392-401, **1990**.
13. Bauer, W. R.; Hiller, K. H.; Galuppo, P.; Neubauer, S.; Kopke, J.; Haase, A.; Waller, C. and Ertl, G. Fast high-resolution magnetic resonance imaging demonstrates fractality of myocardial perfusion in microscopic dimensions. *Circ.Res.* 88: 340-346, **2001**. @
14. Birdsey, G. M.; Leiper, J. M. and Vallance, P. Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line. *Acta Physiol Scand.* 168: 73-79, **2000**. @
15. Blachly-Dyson, E. and Forte, M. VDAC channels. *IUBMB.Life.* 52: 113-118, **2001**. @
16. Blanchetot, A.; Price, M. and Jeffreys, A. J. The mouse myoglobin gene. Characterisation and sequence comparison with other mammalian myoglobin genes. *Eur.J.Biochem.* 159: 469-474, **1986**.
17. Blum, H.; Beier, H. and Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8: 93-99, **1987**.
18. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254, **1976**.
19. Buckberg, G. D.; Fixler, D. E.; Archie, J. P. and Hoffman, J. I. Experimental subendocardial ischemia in dogs with normal coronary arteries. *Circ.Res.* 30: 67-81, **1972**.
20. Bussemaker, J.; Groeneveld, A. B.; Teerlink, T.; Hennekes, M.; Westerhof, N. and van Beek, J. H. Low- and high-blood flow regions in the normal pig heart are equally vulnerable to ischaemia during partial coronary stenosis. *Pflügers Arch.* 434: 785-794, **1997**. @
21. Bussemaker, J.; van Beek, J. H.; Groeneveld, A. B.; Hennekes, M.; Teerlink, T.; Thijs, L. G. and Westerhof, N. Local mitochondrial enzyme activity correlates with myocardial blood flow at basal workloads. *J.Mol.Cell Cardiol.* 26: 1017-1028, **1994**.
22. Caldwell, J. H.; Martin, G. V.; Raymond, G. M. and Bassingthwaite, J. B. Regional myocardial flow and capillary permeability-surface area products are nearly proportional. *Am.J.Physiol.* 267: H654-H666, **1994**. @
23. Campbell, D. L.; Stamler, J. S. and Strauss, H. C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J.Gen.Physiol.* 108: 277-293, **1996**. @

24. Cantor, R. C. and Schimmel, P. R. Biophysical Chemistry: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. *W.H.Freeman & Co.* **1980**.
25. Cole, R. P.; Wittenberg, B. A. and Caldwell, P. R. Myoglobin function in the isolated fluorocarbon-perfused dog heart. *Am.J.Physiol.* 234: H567-H572, **1978**. @
26. Corbett, J. M.; Wheeler, C. H. and Dunn, M. J. Coelectrophoresis of cardiac tissue from human, dog, rat and mouse: towards the establishment of an integrated two-dimensional protein database. *Electrophoresis.* 16: 1524-1529, **1995**.
27. Corbett, J. M.; Why, H. J.; Wheeler, C. H.; Richardson, P. J.; Archard, L. C.; Yacoub, M. H. and Dunn, M. J. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 19: 2031-2042, **1998**.
28. Coumans, J. V.; Yeoh, T.; Seeto, R. K.; Keogh, A.; Brennan, K.; Gunning, P.; Hardeman, E. and dos Remedios, C. G. Variations in the relative mRNA levels of actins and myosin heavy chains do not produce corresponding differences in their proteins in the adult human heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 29: 895-905, **1997**.
29. Crapo, J. D.; McCord, J. M. and Fridovich, I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 53: 382-393, **1978**.
30. Dahlseid, J. N.; Lill, R.; Green, J. M.; Xu, X.; Qiu, Y. and Pierce, S. K. PBP74, a new member of the mammalian 70-kDa heat shock protein family, is a mitochondrial protein. *Mol.Biol.Cell.* 5: 1265-1275, **1994**. @
31. De, P., V; Messina, A.; Accardi, R.; Aiello, R.; Guarino, F.; Tomasello, M. F.; Tommasino, M.; Tasco, G.; Casadio, R.; Benz, R.; De Giorgi, F.; Ichas, F.; Baker, M. and Lawen, A. New functions of an old protein: the eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC). *Ital.J.Biochem.* 52: 17-24, **2003**. @
32. Decking, U. K.; Pai, V. M.; Bennett, E.; Taylor, J. L.; Fingas, C. D.; Zanger, K.; Wen, H. and Balaban, R. S. High-resolution imaging reveals a limit in spatial resolution of blood flow measurements by microspheres. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 287: H1132-H1140, **2004**.
33. Decking, U. K. and Schrader, J. Spatial heterogeneity of myocardial perfusion and metabolism. *Basic Res.Cardiol.* 93: 439-445, **1998**.
34. Decking, U. K.; Skwirba, S.; Zimmermann, M. F.; Preckel, B.; Thamer, V.; Deussen, A. and Schrader, J. Spatial heterogeneity of energy turnover in the heart. *Pflügers Arch.* 441: 663-673, **2001**. @
35. Decking, U. K.; Wen, H.; Pai, V. M. und Balaban, R. S. D<sub>2</sub>O ermöglicht die MR-gestützte, quantitative Erfassung myokardialer Perfusion mit lokaler räumlicher Auflösung. *Abstract.* Institut für Herz- u. Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2004**.

36. Deussen, A. Local myocardial glucose uptake is proportional to, but not dependent on blood flow. *Pflügers Arch.* 433: 488-496, **1997**.
37. Deussen, A. Blood flow heterogeneity in the heart. *Basic Res.Cardiol.* 93: 430-438, **1998**.
38. Deussen, A.; Flesche, C. W.; Lauer, T.; Sonntag, M. and Schrader, J. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. II. Temporal stability in response to adrenergic stimulation. *Pflügers Arch.* 432: 451-461, **1996**. @
39. Deussen, A.; Sonntag, M.; Flesche, C. W. and Vogel, R. M. Minimal effects of nitric oxide on spatial blood flow heterogeneity of the dog heart. *Pflügers Arch.* 433: 727-734, **1997**.
40. Doeller, J. E. and Wittenberg, B. A. Myoglobin function and energy metabolism of isolated cardiac myocytes: effect of sodium nitrite. *Am.J.Physiol.* 261: H53-H62, **1991**. @
41. dos Remedios, C. G.; Berry, D. A.; Carter, L. K.; Coumans, J. V.; Heinke, M. Y.; Kiessling, P. C.; Seeto, R. K.; Thorvaldson, T.; Trahair, T.; Yeoh, T.; Yao, M.; Gunning, P. W.; Hardeman, E.; Humphery-Smith, I.; Naidoo, D. and Keogh, A. Different electrophoretic techniques produce conflicting data in the analysis of myocardial samples from dilated cardiomyopathy patients: protein levels do not necessarily reflect mRNA levels. *Electrophoresis.* 17: 235-238, **1996**.
42. Dunn, M. J.; Corbett, J. M. and Wheeler, C. H. HSC-2DPAGE and the two-dimensional gel electrophoresis database of dog heart proteins. *Electrophoresis.* 18: 2795-2802, **1997**.
43. Eaton, S.; Bartlett, K. and Pourfarzam, M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem.J.* 320 ( Pt 2): 345-357, **1996**. @
44. Eckerskorn, C.; Jungblut, P.; Mewes, W.; Klose, J. and Lottspeich, F. Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. *Electrophoresis.* 9: 830-838, **1988**.
45. Edman, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem.Scand.* 4: 277-293, **1950**.
46. Edman, P. Sequence determination. *Mol.Biol.Biochem.Biophys.* 8: 211-255, **1970**.
47. Falsetti, H. L.; Carroll, R. J. and Marcus, M. L. Temporal heterogeneity of myocardial blood flow in anesthetized dogs. *Circulation.* 52: 848-853, **1975**.
48. Feigl, E. O. Coronary physiology. *Physiol Rev.* 63: 1-205, **1983**. @
49. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F. and Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 246: 64-71, **1989**.

50. Fixler, D. E.; Archie, J. P.; Ulliyot, D. J.; Buckberg, G. D. and Hoffman, J. I. Effects of acute right ventricular systolic hypertension on regional myocardial blood flow in anesthetized dogs. *Am.Heart J.* 85: 491-500, **1973**.
51. Flesch, M.; Kilter, H.; Cremers, B.; Lenz, O.; Sudkamp, M.; Kuhn-Regnier, F. and Bohm, M. Acute effects of nitric oxide and cyclic GMP on human myocardial contractility. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 281: 1340-1349, **1997**. @
52. Flögel, U.; Decking, U. K.; Gödecke, A. and Schrader, J. Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31: 827-836, **1999**.
53. Flögel, U.; Gödecke, A.; Klotz, L. O. and Schrader, J. Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *FASEB J.* 18: 1156-1158, **2004**. @
54. Flögel, U.; Gödecke, A. and Schrader, J. Myoglobin is important for postischemic recovery in the heart. *Circulation.* 104: II-227, **2001**.
55. Flögel, U.; Laussmann, T.; Gödecke, A.; Abanador, N.; Schäfers, M.; Fingas, C. D.; Metzger, S.; Levkau, B.; Jacoby, C. and Schrader, J. Lack of myoglobin causes a switch in cardiac substrate selection. *Circ.Res.* 96: e68-e75, **2005**.
56. Flögel, U.; Merx, M. W.; Gödecke, A.; Decking, U. K. and Schrader, J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98: 735-740, **2001**. @
57. Fountoulakis, M.; Soumaka, E.; Rapti, K.; Mavroidis, M.; Tsangaris, G.; Maris, A.; Weisleder, N. and Capetanaki, Y. Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model. *J.Mol.Cell Cardiol.* 38: 461-474, **2005**. @
58. Franzen, D.; Conway, R. S.; Zhang, H.; Sonnenblick, E. H. and Eng, C. Spatial heterogeneity of local blood flow and metabolite content in dog hearts. *Am.J.Physiol.* 254: H344-H353, **1988**. @
59. Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 58: 61-97, **1986**.
60. Fridovich, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J.Biol.Chem.* 264: 7761-7764, **1989**. @
61. Fuchs, E. and Cleveland, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 279: 514-519, **1998**. @
62. Garry, D. J.; Kanatous, S. B. and Mammen, P. P. Emerging roles for myoglobin in the heart. *Trends Cardiovasc.Med.* 13: 111-116, **2003**.
63. Garry, D. J.; Meeson, A.; Yan, Z. and Williams, R. S. Life without myoglobin. *Cell Mol.Life Sci.* 57: 896-898, **2000**. @

64. Garry, D. J.; Ordway, G. A.; Lorenz, J. N.; Radford, N. B.; Chin, E. R.; Grange, R. W.; Bassel-Duby, R. and Williams, R. S. Mice without myoglobin. *Nature*. 395: 905-908, **1998**. @
65. Gershoni, J. M.; Bayer, E. A. and Wilchek, M. Blot analyses of glycoconjugates: enzyme-hydrazide - a novel reagent for the detection of aldehydes. *Anal.Biochem*. 146: 59-63, **1985**.
66. Ghaleh, B.; Shen, Y. T. and Vatner, S. F. Spatial heterogeneity of myocardial blood flow presages salvage versus necrosis with coronary artery reperfusion in conscious baboons. *Circulation*. 94: 2210-2215, **1996**. @
67. Gharahdaghi, F.; Weinberg, C. R.; Meagher, D. A.; Imai, B. S. and Mische, S. M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*. 20: 601-605, **1999**. @
68. Glabe, A.; Chung, Y.; Xu, D. and Jue, T. Carbon monoxide inhibition of regulatory pathways in myocardium. *Am.J.Physiol*. 274: H2143-H2151, **1998**. @
69. Glatz, J. F.; Schaap, F. G.; Binas, B.; Bonen, A.; van der Vusse, G. J. and Luiken, J. J. Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 178: 367-371, **2003**.
70. Gödecke, A.; Decking, U. K.; Ding, Z.; Hirchenhain, J.; Bidmon, H. J.; Gödecke, S. and Schrader, J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ.Res*. 82: 186-194, **1998**. @
71. Gödecke, A.; Flögel, U.; Zanger, K.; Ding, Z.; Hirchenhain, J.; Decking, U. K. and Schrader, J. Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 96: 10495-10500, **1999**. @
72. Gödecke, A.; Molojavyi, A.; Heger, J.; Flögel, U.; Ding, Z.; Jacoby, C. and Schrader, J. Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress. *J.Biol.Chem*. 278: 21761-21766, **2003**. @
73. Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R. and Weiss, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 21: 1037-1053, **2000**. @
74. Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G. and Weiss, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*. 20: 712-717, **1999**. @
75. Gottlob, K.; Majewski, N.; Kennedy, S.; Kandel, E.; Robey, R. B. and Hay, N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first

committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* 15: 1406-1418, **2001**. @

76. Grange, R. W.; Meeson, A.; Chin, E.; Lau, K. S.; Stull, J. T.; Shelton, J. M.; Williams, R. S. and Garry, D. J. Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 281: C1487-C1494, **2001**. @
77. Granger, B. L. and Lazarides, E. Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell.* 18: 1053-1063, **1979**.
78. Groeneveld, A. B.; van Lambalgen, A. A.; van den Bos, G. C.; Nauta, J. J. and Thijs, L. G. Metabolic vasodilatation with glucose-insulin-potassium does not change the heterogeneous distribution of coronary blood flow in the dog. *Cardiovasc.Res.* 26: 757-764, **1992**.
79. Groeneveld, A. B. and Visser, F. C. Correlation of heterogeneous blood flow and fatty acid uptake in the normal dog heart. *Basic Res.Cardiol.* 88: 223-232, **1993**.
80. Grynberg, A. and Demaison, L. Fatty acid oxidation in the heart. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 28 Suppl 1: S11-S17, **1996**. @
81. Gupta, R. K. and Wittenberg, B. A. 31P-NMR studies of isolated adult heart cells: effect of myoglobin inactivation. *Am.J.Physiol.* 261: H1155-H1163, **1991**. @
82. Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H. and Aebersold, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat.Biotechnol.* 17: 994-999, **1999**. @
83. Hare, J. M.; Keaney, J. F., Jr.; Balligand, J. L.; Loscalzo, J.; Smith, T. W. and Colucci, W. S. Role of nitric oxide in parasympathetic modulation of beta-adrenergic myocardial contractility in normal dogs. *J.Clin.Invest.* 95: 360-366, **1995**. @
84. Hare, J. M.; Lofthouse, R. A.; Juang, G. J.; Colman, L.; Ricker, K. M.; Kim, B.; Senzaki, H.; Cao, S.; Tunin, R. S. and Kass, D. A. Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circ.Res.* 86: 1085-1092, **2000**. @
85. Hartzell, H. C. and Fischmeister, R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells. *Nature.* 323: 273-275, **1986**.
86. Heinke, M. Y.; Wheeler, C. H.; Chang, D.; Einstein, R.; Drake-Holland, A.; Dunn, M. J. and dos Remedios, C. G. Protein changes observed in pacing-induced heart failure using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 19: 2021-2030, **1998**.

87. Heinke, M. Y.; Wheeler, C. H.; Yan, J. X.; Amin, V.; Chang, D.; Einstein, R.; Dunn, M. J. and dos Remedios, C. G. Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure. *Electrophoresis*. 20: 2086-2093, **1999**. @
88. Heukeshoven, J. and Dernick, R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*. 9: 28-32, **1988**.
89. Hoffman, J. I. Heterogeneity of myocardial blood flow. *Basic Res. Cardiol.* 90: 103-111, **1995**.
90. Hoppeler, H. and Weibel, E. R. Limits for oxygen and substrate transport in mammals. *J. Exp. Biol.* 201: 1051-1064, **1998**. @
91. Ibdah, J. A.; Paul, H.; Zhao, Y.; Binford, S.; Salleng, K.; Cline, M.; Matern, D.; Bennett, M. J.; Rinaldo, P. and Strauss, A. W. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J. Clin. Invest.* 107: 1403-1409, **2001**. @
92. Ikeda, Y. and Tanaka, K. Purification and characterization of isovaleryl coenzyme A dehydrogenase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 258: 1077-1085, **1983**. @
93. Iversen, P. O. Evidence for long-term fluctuations in regional blood flow within the rabbit left ventricle. *Acta Physiol Scand.* 146: 329-339, **1992**.
94. Jackson, R. M.; Parish, G. and Ho, Y. S. Effects of hypoxia on expression of superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 271: L955-L962, **1996**. @
95. Janosi, R. A. Räumliche Heterogenität und zeitliche Stabilität des lokalen myokardialen Flussmusters - Untersuchungen der lokalen Depositionsdichte nach Gabe von Mikrosphären am wachen Hund. *Dissertationsschrift*. **2004**.
96. Jiang, K. W.; Yang, C. W.; Shui, Q. X.; Xia, Z. Z. and Zhang, Y. [Time-course of mu-calpain activation, c-Fos, c-Jun, HSP70 and HSP27 expression in hypoxic-ischemic neonatal rat brain]. *Zhonghua Er.Ke.Za Zhi.* 42: 441-445, **2004**.
97. Jürgens, K. D.; Peters, T. and Gros, G. Diffusivity of myoglobin in intact skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3829-3833, **1994**. @
98. Jynge, P.; Hearse, D. J.; Feuvray, D.; Mahalu, W.; Cankovic-Darracott, S.; O'Brien, K. and Braimbridge, M. V. The St. Thomas' hospital cardioplegic solution: a characterization in two species. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. Suppl.* 30: 1-28, **1981**.

99. Kakimoto, Y. and Akazawa, S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J.Biol.Chem.* 245: 5751-5758, **1970**. @
100. Karas, M. and Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal.Chem.* 60: 2299-2301, **1988**.
101. Kassab, G. S.; Rider, C. A.; Tang, N. J. and Fung, Y. C. Morphometry of pig coronary arterial trees. *Am.J.Physiol.* 265: H350-H365, **1993**. @
102. Kay, L.; Li, Z.; Mericskay, M.; Olivares, J.; Tranqui, L.; Fontaine, E.; Tiivel, T.; Sikk, P.; Kaambre, T.; Samuel, J. L.; Rappaport, L.; Usson, Y.; Leverage, X.; Paulin, D. and Saks, V. A. Study of regulation of mitochondrial respiration *in vivo*. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. *Biochim.Biophys.Acta.* 1322: 41-59, **1997**. @
103. Khan, S. A. and Hare, J. M. The role of nitric oxide in the physiological regulation of Ca<sup>2+</sup> cycling. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* 6: 658-666, **2003**.
104. Khan, S. A.; Skaf, M. W.; Harrison, R. W.; Lee, K.; Minhas, K. M.; Kumar, A.; Fradley, M.; Shoukas, A. A.; Berkowitz, D. E. and Hare, J. M. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ.Res.* 92: 1322-1329, **2003**. @
105. Kim, D.; Somji, S.; Garrett, S. H.; Sens, M. A.; Shukla, D. and Sens, D. A. Expression of hsp 27, hsp 60, hsc 70, and hsp 70 by immortalized human proximal tubule cells (HK-2) following exposure to heat shock, sodium arsenite, or cadmium chloride. *J.Toxicol.Environ.Health A.* 63: 475-493, **2001**.
106. King, R. B. and Bassingthwaight, J. B. Temporal fluctuations in regional myocardial flows. *Pflügers Arch.* 413: 336-342, **1989**.
107. King, R. B.; Bassingthwaight, J. B.; Hales, J. R. and Rowell, L. B. Stability of heterogeneity of myocardial blood flow in normal awake baboons. *Circ.Res.* 57: 285-295, **1985**.
108. Kirby, R.; Cho, E. J.; Gehrke, B.; Bayer, T.; Park, Y. S.; Neikirk, D. P.; McDevitt, J. T. and Ellington, A. D. Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. *Anal.Chem.* 76: 4066-4075, **2004**. @
109. Klemenz, R.; Scheier, B.; Muller, A.; Steiger, R. and Aoyama, A. Alpha B crystallin expression in response to hormone, oncogenes and stress. *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.* 78: 34-35, **1994**.
110. 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**.

111. Klose, J. Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. *Methods Mol.Biol.* 112: 67-85, **1999**.
112. Klose, J. Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol.Biol.* 112: 147-172, **1999**.
113. Korvald, C.; Elvenes, O. P. and Myrnes, T. Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics *in vivo*. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 278: H1345-H1351, **2000**. @
114. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, **1970**.
115. Latchman, D. S. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc.Res.* 51: 637-646, **2001**.
116. Lauer, T.; Loncar, R. and Deussen, A. Tracer adenosine: a novel myocardial flow marker. *J.Nucl.Med.* 44: 641-648, **2003**. @
117. Laussmann, T.; Janosi, R. A.; Fingas, C. D.; Schlieper, G. R.; Schlack, W.; Schrader, J. and Decking, U. K. Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition and enhanced glycolytic capacity in areas of low local blood flow. *FASEB J.* 16: 628-630, **2002**. @
118. Lee, J. W. and Lee, S. K. Mammalian two-hybrid assay for detecting protein-protein interactions *in vivo*. *Methods Mol.Biol.* 261: 327-336, **2004**.
119. Leiper, J. and Vallance, P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc.Res.* 43: 542-548, **1999**. @
120. Leiper, J. M.; Santa, M. J.; Chubb, A.; MacAllister, R. J.; Charles, I. G.; Whitley, G. S. and Vallance, P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem.J.* 343 Pt 1: 209-214, **1999**.
121. Levy, M. N. and Martins, D. O. Regional distribution of myocardial blood flow in the dog as determined by Rb86. *Circ.Res.* 9: 96-98, **1961**.
122. Liochev, S. I.; Benov, L.; Touati, D. and Fridovich, I. Induction of the soxRS regulon of *Escherichia coli* by superoxide. *J.Biol.Chem.* 274: 9479-9481, **1999**. @
123. Liochev, S. I. and Fridovich, I. Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 5892-5896, **1992**. @
124. Löffler, G. und Petrides, P. Biochemie und Pathobiochemie. *Lehrbuch, Springer Verlag.* **2003**.

125. Loncar, R.; Flesche, C. W. and Deussen, A. Coronary reserve of high- and low-flow regions in the dog heart left ventricle. *Circulation*. 98: 262-270, **1998**. @
126. Lopez, M. F. Better approaches to finding the needle in a haystack: optimizing proteome analysis through automation. *Electrophoresis*. 21: 1082-1093, **2000**. @
127. Loscalzo, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ.Res.* 88: 756-762, **2001**. @
128. Lottspeich, F. and Zorbas, H. Bioanalytik. *Methodenbuch, Spektrum Akademischer Verlag*. **1998**.
129. Love, W. D. and Burch, G. E. Differences in the rate of Rb86 uptake by several regions of the myocardium of control dogs and dogs receiving 1-norepinephrine or pitressin. *J.Clin.Invest.* 36: 479-484, **1957**.
130. Malloy, C. R.; Thompson, J. R.; Jeffrey, F. M. and Sherry, A. D. Contribution of exogenous substrates to acetyl coenzyme A: measurement by <sup>13</sup>C NMR under non-steady-state conditions. *Biochemistry*. 29: 6756-6761, **1990**.
131. Mammen, P. P.; Kanatous, S. B.; Yuhanna, I. S.; Shaul, P. W.; Garry, M. G.; Balaban, R. S. and Garry, D. J. Hypoxia-induced left ventricular dysfunction in myoglobin-deficient mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 285: H2132-H2141, **2003**. @
132. Mamyryn, B. A. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int.J.Mass Spectrom.Ion Processes*. 131: 1-19, **1994**.
133. Marcus, M. L.; Kerber, R. E.; Erhardt, J. C.; Falsetti, H. L.; Davis, D. M. and Abboud, F. M. Spatial and temporal heterogeneity of left ventricular perfusion in awake dogs. *Am.Heart J.* 94: 748-754, **1977**.
134. Martin, J. L.; Mestril, R.; Hilal-Dandan, R.; Brunton, L. L. and Dillmann, W. H. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation*. 96: 4343-4348, **1997**. @
135. Matsui, N. M.; Smith-Beckerman, D. M.; Fichmann, J. and Epstein, L. B. Running preparative carrier ampholyte and immobilized pH gradient IEF gels for 2-D. *Methods Mol.Biol.* 112: 211-219, **1999**.
136. Meeson, A. P.; Radford, N.; Shelton, J. M.; Mammen, P. P.; DiMaio, J. M.; Hutcheson, K.; Kong, Y.; Elterman, J.; Williams, R. S. and Garry, D. J. Adaptive mechanisms that preserve cardiac function in mice without myoglobin. *Circ.Res.* 88: 713-720, **2001**.
137. Mela, L. and Seitz, S. Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods Enzymol.* 55: 39-46, **1979**.

138. Merrill, C. R.; Goldman, D.; Sedman, S. A. and Ebert, M. H. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*. 211: 1437-1438, **1981**.
139. Merx, M. W.; Flögel, U.; Stumpe, T.; Gödecke, A.; Decking, U. K. and Schrader, J. Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *FASEB J.* 15: 1077-1079, **2001**. @
140. Millikan, G. A. Experiments on muscle haemoglobin *in vivo*; the instantaneous measurement of muscle metabolism. *Proc.Roy.Soc.(London), Ser.B.* 123: 218-241, **1937**.
141. Milner, D. J.; Mavroidis, M.; Weisleder, N. and Capetanaki, Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J.Cell Biol.* 150: 1283-1298, **2000**. @
142. Monteoliva, L. and Albar, J. P. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.* 3: 220-239, **2004**.
143. Mora, J. F.; Van Berkel, G. J.; Enke, C. G.; Cole, R. B.; Martinez-Sanchez, M. and Fenn, J. B. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* 35: 939-952, **2000**. @
144. Müllenheim, J.; Preckel, B.; Obal, D.; Heiderhoff, M.; Hoff, J.; Thamer, V. and Schlack, W. Left stellate ganglion block has only small effects on left ventricular function in awake dogs before and after induction of heart failure. *Anesth.Analg.* 91: 787-792, **2000**. @
145. Munz, B.; Frank, S.; Hubner, G.; Olsen, E. and Werner, S. A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. *Biochem.J.* 326 ( Pt 2): 579-585, **1997**. @
146. Murad, F. What are the molecular mechanisms for the antiproliferative effects of nitric oxide and cGMP in vascular smooth muscle? *Circulation.* 95: 1101-1103, **1997**. @
147. Murray, P. A.; Baig, H.; Fishbein, M. C. and Vatner, S. F. Effects of experimental right ventricular hypertrophy on myocardial blood flow in conscious dogs. *J.Clin.Invest.* 64: 421-427, **1979**.
148. Nagy, A.; Rossant, J.; Nagy, R.; Abramow-Newerly, W. and Roder, J. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 8424-8428, **1993**. @
149. Nakagomi, S.; Kiryu-Seo, S.; Kimoto, M.; Emson, P. C. and Kiyama, H. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) as a nerve-injury-associated molecule: mRNA localization in the rat brain and its coincident up-regulation with neuronal NO synthase (nNOS) in axotomized motoneurons. *Eur.J.Neurosci.* 11: 2160-2166, **1999**.

150. Neuffer, P. D. and Benjamin, I. J. Differential expression of B-crystallin and Hsp27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. *J.Biol.Chem.* 271: 24089-24095, **1996.** @
151. Ng, J. H. and Ilag, L. L. Biomedical applications of protein chips. *J.Cell Mol.Med.* 6: 329-340, **2002.** @
152. O'Brien, P. J.; O'Grady, M.; McCutcheon, L. J.; Shen, H.; Nowack, L.; Horne, R. D.; Mirsalimi, S. M.; Julian, R. J.; Grima, E. A.; Moe, G. W. and . Myocardial myoglobin deficiency in various animal models of congestive heart failure. *J.Mol.Cell Cardiol.* 24: 721-730, **1992.**
153. O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250: 4007-4021, **1975.** @
154. Oakley, B. R.; Kirsch, D. R. and Morris, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* 105: 361-363, **1980.**
155. Ogawa, T.; Kimoto, M. and Sasaoka, K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J.Biol.Chem.* 264: 10205-10209, **1989.** @
156. Ohman, T.; Parish, G. and Jackson, R. M. Hypoxic modulation of manganese superoxide dismutase promoter activity and gene expression in lung epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 21: 119-127, **1999.** @
157. Okubo, T.; Suto, N.; Kudo, S.; Hanada, H.; Mikuniya, A. and Okumura, K. A study on the effects of endogenous nitric oxide on coronary blood flow, myocardial oxygen extraction and cardiac contractility. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 13: 34-42, **1999.**
158. Ordway, G. A. and Garry, D. J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J.Exp.Biol.* 207: 3441-3446, **2004.** @
159. Orii, K. E.; Aoyama, T.; Souri, M.; Jiang, L. L.; Orii, K. O.; Hayashi, S.; Yamaguchi, S.; Kondo, N.; Orii, T. and Hashimoto, T. Formation of the enzyme complex in mitochondria is required for function of trifunctional beta-oxidation protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 219: 773-777, **1996.**
160. Pandey, A. and Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 405: 837-846, **2000.** @
161. Pappin, D. J.; Hojrup, P. and Bleasby, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr.Biol.* 3: 327-332, **1993.** @
162. Parcellier, A.; Schmitt, E.; Brunet, M.; Hammann, A.; Solary, E. and Garrido, C. Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. *Antioxid.Redox.Signal.* 7: 404-413, **2005.**

163. Patel, V. B.; Corbett, J. M.; Dunn, M. J.; Winrow, V. R.; Portmann, B.; Richardson, P. J. and Preedy, V. R. Protein profiling in cardiac tissue in response to the chronic effects of alcohol. *Electrophoresis*. 18: 2788-2794, **1997**.
164. Patton, W. F. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*. 21: 1123-1144, **2000**. @
165. Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M. and Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20: 3551-3567, **1999**.
166. Petrashevskaya, N. N.; Koch, S. E.; Bodi, I. and Schwartz, A. Calcium cycling, historic overview and perspectives. Role for autonomic nervous system regulation. *J.Mol.Cell Cardiol*. 34: 885-896, **2002**.
167. Pettersson, A.; Ugglå, L. and Backman, V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl*. 692: 257-262, **1997**. @
168. Plattner, H. und Zingsheim, H. P. Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. *Methodenbuch, Gustav Fischer Verlag*. Kapitel 4.8. **1987**.
169. Pleißner, K. P.; Regitz-Zagrosek, V.; Krudewagen, B.; Trenkner, J.; Hoher, B. and Fleck, E. Effects of renovascular hypertension on myocardial protein patterns: analysis by computer-assisted two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 19: 2043-2050, **1998**.
170. Pleißner, K. P.; Regitz-Zagrosek, V.; Weise, C.; Neuss, M.; Krudewagen, B.; Soding, P.; Buchner, K.; Hucho, F.; Hildebrandt, A. and Fleck, E. Chamber-specific expression of human myocardial proteins detected by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 16: 841-850, **1995**.
171. Ramagli, L. S. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. *Methods Mol.Biol*. 112: 99-103, **1999**.
172. Ramirez, J.; Rodriguez, E. and Weiss, H. R. Effect of isoproterenol on the relationship between regional cyclic AMP and local coronary blood flow in the canine myocardium. *Pharmacology*. 48: 41-48, **1994**.
173. Rodriguez, E. and Weiss, H. R. Relationship between local myocardial adenylyl cyclase activity and local coronary blood flow in the dog heart. *J.Auton.Pharmacol*. 13: 95-103, **1993**.
174. Rose, C. P. and Goresky, C. A. Vasomotor control of capillary transit time heterogeneity in the canine coronary circulation. *Circ.Res*. 39: 541-554, **1976**.

175. Rossi, M. R.; Somji, S.; Garrett, S. H.; Sens, M. A.; Nath, J. and Sens, D. A. Expression of hsp 27, hsp 60, hsc 70, and hsp 70 stress response genes in cultured human urothelial cells (UROtsa) exposed to lethal and sublethal concentrations of sodium arsenite. *Environ.Health Perspect.* 110: 1225-1232, **2002.** @
176. Rostovtseva, T. and Colombini, M. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J.Biol.Chem.* 271: 28006-28008, **1996.** @
177. Rostovtseva, T. and Colombini, M. VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys.J.* 72: 1954-1962, **1997.**
178. Rudolph, A. M. and Heymann, M. A. The circulation of the fetus *in utero*. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ.Res.* 21: 163-184, **1967.**
179. Russell, W. J. and Jackson, R. M. MnSOD protein content changes in hypoxic/hypoperfused lung tissue. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 9: 610-616, **1993.**
180. Santoni, V.; Molloy, M. and Rabilloud, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis.* 21: 1054-1070, **2000.** @
181. Schagger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.* 166: 368-379, **1987.**
182. Scheler, C.; Li, X. P.; Salnikow, J.; Dunn, M. J. and Jungblut, P. R. Comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of heat shock protein Hsp27 species in normal and cardiomyopathic hearts. *Electrophoresis.* 20: 3623-3628, **1999.** @
183. Schlieper, G.; Kim, J. H.; Molojavyi, A.; Jacoby, C.; Laussmann, T.; Flögel, U.; Gödecke, A. and Schrader, J. Adaptation of the myoglobin knockout mouse to hypoxic stress. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.* 286: R786-R792, **2004.** @
184. Schratzenholz, A. Methoden der Proteomforschung. *Methodenbuch, Spektrum Akademischer Verlag/Gustav Fischer.* **2001.**
185. Schriemer, D. C. and Li, L. Combining avidin-biotin chemistry with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal.Chem.* 68: 3382-3387, **1996.** @
186. Schriemer, D. C.; Yalcin, T. and Li, L. MALDI mass spectrometry combined with avidin-biotin chemistry for analysis of protein modifications. *Anal.Chem.* 70: 1569-1575, **1998.** @

187. Schroeder, F.; Jolly, C. A.; Cho, T. H. and Frolov, A. Fatty acid binding protein isoforms: structure and function. *Chem.Phys.Lipids*. 92: 1-25, **1998**. @
188. Schwarzer, C.; Barnikol-Watanabe, S.; Thinner, F. P. and Hilschmann, N. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int.J.Biochem.Cell Biol*. 34: 1059-1070, **2002**.
189. Semenza, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J.Appl.Physiol*. 88: 1474-1480, **2000**. @
190. Serebriiskii, I. G. and Kotova, E. Analysis of protein-protein interactions utilizing dual bait yeast two-hybrid system. *Methods Mol.Biol*. 261: 263-296, **2004**.
191. Sestier, F. J.; Mildenerger, R. R. and Klassen, G. A. Role of autoregulation in spatial and temporal perfusion heterogeneity of canine myocardium. *Am.J.Physiol*. 235: H64-H71, **1978**. @
192. Shevchenko, A.; Chernushevich, I.; Ens, W.; Standing, K. G.; Thomson, B.; Wilm, M. and Mann, M. Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun.Mass Spectrom*. 11: 1015-1024, **1997**. @
193. Sonntag, M.; Deussen, A. and Schrader, J. Role of nitric oxide in local blood flow control in the anaesthetized dog. *Pflügers Arch*. 420: 194-199, **1992**.
194. Sonntag, M.; Deussen, A.; Schultz, J.; Loncar, R.; Hort, W. and Schrader, J. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. I. Glucose uptake, free adenosine and oxidative/glycolytic enzyme activity. *Pflügers Arch*. 432: 439-450, **1996**. @
195. Spurr, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J.Ultrastruct.Res*. 26: 31-43, **1969**.
196. Stoll, M.; Schlack, W.; Schrader, J. and Decking, U. K. Cardiac potassium channel expression correlates with blood flow heterogeneity. *Poster*. Institut für Herz- u. Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2004**.
197. Suga, H. Ventricular energetics. *Physiol Rev*. 70: 247-277, **1990**. @
198. Taylor, D. J.; Matthews, P. M. and Radda, G. K. Myoglobin-dependent oxidative metabolism in the hypoxic rat heart. *Respir.Physiol*. 63: 275-283, **1986**.

199. Tojo, A.; Welch, W. J.; Bremer, V.; Kimoto, M.; Kimura, K.; Omata, M.; Ogawa, T.; Vallance, P. and Wilcox, C. S. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int.* 52: 1593-1601, **1997**.
200. Toraason, M.; Moorman, W.; Mathias, P. I.; Fultz, C. and Witzmann, F. Two-dimensional electrophoretic analysis of myocardial proteins from lead-exposed rabbits. *Electrophoresis.* 18: 2978-2982, **1997**.
201. Tran, C. T.; Fox, M. F.; Vallance, P. and Leiper, J. M. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics.* 68: 101-105, **2000**.
202. Trochu, J. N.; Bouhour, J. B.; Kaley, G. and Hintze, T. H. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implications in health and disease. *Circ.Res.* 87: 1108-1117, **2000**. @
203. Tusher, V. G.; Tibshirani, R. and Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98: 5116-5121, **2001**. @
204. Uchida, Y.; Izai, K.; Orii, T. and Hashimoto, T. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J.Biol.Chem.* 267: 1034-1041, **1992**. @
205. Unlu, M.; Morgan, M. E. and Minden, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 18: 2071-2077, **1997**.
206. Ushikubo, S.; Aoyama, T.; Kamijo, T.; Wanders, R. J.; Rinaldo, P.; Vockley, J. and Hashimoto, T. Molecular characterization of mitochondrial trifunctional protein deficiency: formation of the enzyme complex is important for stabilization of both alpha- and beta-subunits. *Am.J.Hum.Genet.* 58: 979-988, **1996**.
207. Vallance, P.; Leone, A.; Calver, A.; Collier, J. and Moncada, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 339: 572-575, **1992**.
208. van Beek, J. H.; Bassingthwaite, J. B. and Roger, S. A. Fractal networks explain regional myocardial flow heterogeneity. *Adv.Exp.Med.Biol.* 248: 249-257, **1989**.
209. van Beek, J. H.; Roger, S. A. and Bassingthwaite, J. B. Regional myocardial flow heterogeneity explained with fractal networks. *Am.J.Physiol.* 257: H1670-H1680, **1989**. @

210. Van Oosterhout, M. F.; Prinzen, F. W.; Sakurada, S.; Glenny, R. W. and Hales, J. R. Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am.J.Physiol.* 275: H110-H115, **1998**. @
211. Varghese, P.; Harrison, R. W.; Lofthouse, R. A.; Georgakopoulos, D.; Berkowitz, D. E. and Hare, J. M. beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J.Clin.Invest.* 106: 697-703, **2000**. @
212. Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A.; Holt, R. A.; Gocayne, J. D.; Amanatides, P.; Ballew, R. M.; Huson, D. H.; Wortman, J. R.; Zhang, Q.; Kodira, C. D.; Zheng, X. H.; Chen, L.; Skupski, M.; Subramanian, G.; Thomas, P. D.; Zhang, J.; Gabor Miklos, G. L.; Nelson, C.; Broder, S.; Clark, A. G.; Nadeau, J.; McKusick, V. A.; Zinder, N.; Levine, A. J.; Roberts, R. J.; Simon, M.; Slayman, C.; Hunkapiller, M.; Bolanos, R.; Delcher, A.; N. and Nodell, M.; et al. The sequence of the human genome. *Science.* 291: 1304-1351, **2001**. @
213. Vincent, R.; Chang, L. Y.; Slot, J. W. and Crapo, J. D. Quantitative immunocytochemical analysis of Mn SOD in alveolar type II cells of the hyperoxic rat. *Am.J.Physiol.* 267: L475-L481, **1994**. @
214. Voet, D. and Voet, J. G. Biochemie. *Wiley-VCH.* **1992**.
215. Volkl, A.; Mohr, H. and Fahimi, H. D. Peroxisome subpopulations of the rat liver. Isolation by immune free flow electrophoresis. *J.Histochem.Cytochem.* 47: 1111-1118, **1999**. @
216. Wadhwa, R.; Taira, K. and Kaul, S. C. An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress.Chaperones.* 7: 309-316, **2002**. @
217. Weekes, J.; Wheeler, C. H.; Yan, J. X.; Weil, J.; Eschenhagen, T.; Scholtysik, G. and Dunn, M. J. Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis.* 20: 898-906, **1999**. @
218. Weil, J.; Eschenhagen, T.; Magnussen, O.; Mittmann, C.; Orthey, E.; Scholz, H.; Schafer, H. and Scholtysik, G. Reduction of myocardial myoglobin in bovine dilated cardiomyopathy. *J.Mol.Cell Cardiol.* 29: 743-751, **1997**.
219. Weinberger, M. J.; Rinaldo, P.; Strauss, A. W. and Bennett, M. J. Intact alpha-subunit is required for membrane-binding of human mitochondrial trifunctional beta-oxidation protein, but is not necessary for conferring 3-ketoacyl-CoA thiolase activity to the beta-subunit. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 209: 47-52, **1995**.

220. Weinberger, S. R.; Boschetti, E.; Santambien, P. and Brenac, V. Surface-enhanced laser desorption-ionization retentate chromatography mass spectrometry (SELDI-RC-MS): a new method for rapid development of process chromatography conditions. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 782: 307-316, **2002**.
221. Weiss, H. R.; Sadoff, J. D.; Scholz, P. M. and Klabunde, R. E. Nitric oxide reduces myocardial contractility in isoproterenol-stimulated rat hearts by a mechanism independent of cyclic GMP or cyclic AMP. *Pharmacology.* 55: 202-210, **1997**.
222. Wilkins, M. R.; Sanchez, J. C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F. and Williams, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol.Genet.Eng Rev.* 13: 19-50, **1996**.
223. Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. Transport of oxygen in muscle. *Annu.Rev.Physiol.* 51: 857-878, **1989**.
224. Wittenberg, J. B. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiol Rev.* 50: 559-636, **1970**. @
225. Wood, S. A.; Pascoe, W. S.; Schmidt, C.; Kemler, R.; Evans, M. J. and Allen, N. D. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 4582-4585, **1993**. @
226. Wunderlich, C.; Flögel, U.; Gödecke, A.; Heger, J. and Schrader, J. Acute inhibition of myoglobin impairs contractility and energy state of iNOS-overexpressing hearts. *Circ.Res.* 92: 1352-1358, **2003**. @
227. Xie, Y. W.; Shen, W.; Zhao, G.; Xu, X.; Wolin, M. S. and Hintze, T. H. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration *in vitro*. Implications for the development of heart failure. *Circ.Res.* 79: 381-387, **1996**. @
228. Xu, K. Y.; Huso, D. L.; Dawson, T. M.; Bredt, D. S. and Becker, L. C. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 657-662, **1999**. @
229. Xu, L.; Eu, J. P.; Meissner, G. and Stamler, J. S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* 279: 234-237, **1998**. @
230. Yates, J. R., III. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J.Mass Spectrom.* 33: 1-19, **1998**. @
231. Yipintsoi, T.; Dobbs, W. A., Jr.; Scanlon, P. D.; Knopp, T. J. and Bassingthwaight, J. B. Regional distribution of diffusible tracers and carbonized microspheres in the left ventricle of isolated dog hearts. *Circ.Res.* 33: 573-587, **1973**.

232. Yu, S. M.; Hung, L. M. and Lin, C. C. cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation*. 95: 1269-1277, **1997**. @
233. Yuk, J. S. and Ha, K. S. Proteomic applications of surface plasmon resonance biosensors: analysis of protein arrays. *Exp.Mol.Med*. 37: 1-10, **2005**. @

@) (Ovid) Full Text/Express Text im Internet frei zugänglich via PubMed resp. EZB Düsseldorf.

## 5.2 Abkürzungen

$\bar{x}$	Mittelwert	cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
$O_2^-$	Superoxidion	CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
*	meist: signifikant, $P < 0.05$	cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule (Einheit des Druckes)
**	meist: sehr signifikant, $P < 0, 01$	CO	Kohlenmonoxid
***	meist: hoch signifikant, $P < 0,001$	CoA	Koenzym A
-/-	heterozygot mutiert (Myoglobin)	cps	counts per second
$[Ca^{2+}]_i$	intrakardiomyozytäre zytosolische $Ca^{2+}$ -Konzentrationsschwankungen	C <sub>T</sub>	threshold cycle (RTD-PCR)
+/-	heterozygot (Myoglobin)	cv	koronarvenöser
+/+	WT (Myoglobin)	CV	coefficient of variation
°C	Grad Celsius	CV <sub>meth</sub>	methodischer Variationskoeffizient
<sup>113</sup> Sn	Zinn-Isotop	CV <sub>obs</sub>	beobachteter Variationskoeffizient
<sup>13</sup> C	Kohlenstoff-Isotop	cvP <sub>O<sub>2</sub></sub>	koronarvenöser Sauerstoffpartialdruck
<sup>153</sup> Gd	Gadolinium-Isotop	CV <sub>spatial</sub>	wahrer Variationskoeffizient
<sup>18</sup> F	Fluor-Isotop	CV <sub>temp</sub>	zeitlicher Variationskoeffizient
2D	zweidimensional	d	Dezi (10 <sup>-2</sup> ); Tag(e)
<sup>31</sup> P	Phosphat	D.E.R	diglycidyl ether of polypropylene glycol (Diepoxid für Proben-einbettung)
<sup>46</sup> Sc	Scandium-Isotop	736	Deuterium (schweres Wasser)
a	m/z bezogen auf die Aminotermini (ESI-MS/MS-Spektrum)	Da	Dalton (veraltete Einheit der atomaren Masse; entspricht 1 u)
A	Ampere (Einheit der Stromstärke)	DDAH1	N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin-Dimethylaminohydrolase 1
a. U.	arbitrary units (willkürliche Einheiten)	DIGE	difference gel electrophoresis
Abs	Absorption	DMAE	siehe S <sub>1</sub>
ACn	Acetonitril	DNA	desoxyribonucleic acid
ADMA	asymmetrisches N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin	dP/dt <sub>max</sub>	maximale Druckänderung über der Zeit
ADP	Adenosin-Diphosphat	dP/dt <sub>min</sub>	minimale Druckänderung über der Zeit
AK	Antikörper	dpi	dots per inch (Auflösungsmaß)
amu	atomic mass unit(s)	ds-DNA	double-stranded DNA (Doppelstrang-DNA)
Antifoam	Silikonpolymer	DTT	Dithiothreitol
SO-25		EBI	European Bioinformatics Institute
APS	Ammoniumperoxodisulfat	EC	Enzyme Nomenclature
AS	Aminosäure(n)	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Chelatbildner)
ATP	Adenosintriphosphat	EM	Elektronenmikroskopie
BD <sub>mitt.</sub>	mittlerer Blutdruck	Em <sub>max</sub>	Wellenlänge maximaler Emission
BD <sub>sys.t. u. diast.</sub>	systolischer und diastolischer Blutdruck	eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
BE	base excess (Gesamtblutpufferabweichung vom Normalwert 48 mmol/l)	ERG	Ether-a-go-go related gene potassium channel 1
BF	Blutfluss	ERL-4206	4-Vinylcyclohexene Dioxide (Diepoxid für Probeneinbettung)
Bis	N, N'-Methylen-Bisacrylamid	ESI-MS/MS	electrospray-ionisation tandem mass spectrometry
BP	Basenpaar(e)	ETF <sub>(β)</sub>	Electron Transfer Flavoprotein (β-Untereinheit)
Bq	Becquerel (Einheit der radioaktiven Aktivität in s <sup>-1</sup> )	eV	Elektronenvolt (Einheit der Energie)
BSA	bovines Serumalbumin	Ex <sub>max</sub>	Wellenlänge maximaler Exzitation
C	Konzentration; Vernetzungsgrad; Kohlenstoff	ExpASy	expert protein analysis system
c	Zenti-(10 <sup>2</sup> )		
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion		
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat		
ccpm	corrected counts per minute		
cDNA	complementary copy desoxyribonucleic acid		

EZB	Elektronische Zeitschriftenbibliothek	LM	Lichtmikroskopie
f	Frequenz	L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginine-Methylester (NOS-Inhibitor)
F2	zweite Folgegeneratin	LVP	left ventricular pressure
FABP	Fatty Acid Binding Protein	m	Meter; Milli (10 <sup>-3</sup> )
FAD	Flavin-Adenin-Nukleotid	M	molar (Mol/l); Mega (10 <sup>6</sup> )
FADH <sub>2</sub>	wasserstofftragendes Flavin-Adenin-Nukleotid	m/z	Masse-Ladungsverhältnis (in der Massenspektrometrie)
FDG	<sup>18</sup> F-Desoxyglukose	MALDI-	matrix-assisted laser-desorption/ionisation time-of-flight post-
FG	Feuchtgewicht	TOF-	source-decay mass spectrometry
FWER	family-wise error rate	PSD-MS	Myoglobin
g	Gramm	Mb	Blutfluss
g	immobilisierter pH-Gradient	MBF	oxygeniertes Myoglobin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	MbO <sub>2</sub>	Verhältnis von Hämoglobin [g/l] zu Hämatokrit [l/l] in g/l
Grp	glucose-related protein (auch: PBP)	MCHC	Metmyoglobin (3-wertiges Eisen)
h	Stunde	metMb	Minuten
H <sub>2</sub> O	Wasser	min	Minuten
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffsuperoxid	MLC 1	hier: Myosin; leichte Kette 1, ventrikuläre Isoform
HADH	Short Chain-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	MLC 2	hier: Myosin; regulatorische leichte Kette 1, ventrikuläre Isoform
HDL	high density lipoprotein	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Einheit des Druckes)
HF	Hochfluss (bezüglich myokardialer Durchblutung); Herzfrequenz	MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
HIF	hypoxia-inducible factor	Mol	molekulare Einheit der Stoffmenge
HPLC	high performance/pressure liquid chromatography	MOWSE	Molecular Weight Search
HSP74	Heat shock protein 74 (Mitochondriales Stress-70-Protein)	M <sub>r</sub>	relative Molekularmasse (dimensionslos)
i.v.	intravenös	MRI	magnetic resonance imaging
I <sub>Ca<sup>2+</sup>, L</sub>	kardiomyozytärer L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Strom	mRNA	messenger ribonucleic acid
ICAT	isotope-coded affinity tag	MS	Massenspektrometrie
IEF	isoelektrische Fokussierung	MTP <sub>α/β</sub>	Mitochondriales Trifunktionales Protein; α-/ β-Untereinheit
IEM	ion evaporation model	Myo <sup>-/-</sup>	Myoglobin-Knockout
IEP	isoelektrischer Punkt	n	Nano (10 <sup>-9</sup> ); Proben-, Versuchstierzahl, etc,
I <sub>K, r</sub>	verzögerter K <sup>+</sup> -Gleichrichterstrom (schnelle/rapide Komponente)	n. i.	nicht identifiziert
I <sub>K, s</sub>	verzögerter K <sup>+</sup> -Gleichrichterstrom (langsame Komponente)	NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
IMM	innere Mitochondrienmembran	NADPH/	wasserstofftragendes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-synthase	H <sup>+</sup>	
J	Joule (Einheit der Energie)	NCBI	National Center for Biotechnology Information
K	Kelvin (Einheit der Temperatur)	NEPHGE	nonequilibrium pH gel electrophoresis
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )	NF	Niedrigfluss (bezüglich myokardialer Durchblutung)
K <sup>+</sup>	Kaliumion	NL	nicht lineare (IPGs)
kb	Kilobasen	NMR	nuclear magnetic resonance
Kette Å	Ångström (alte Längeneinheit; 10 <sup>-10</sup> m)	NO	Stickstoffmonoxid
KG	Körpergewicht	NO <sup>3-</sup>	Nitrat
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante (hier: für NOS)	NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante (Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wird)	NSA	2-Nonenyl-1-succinic Anhydride (Härter für Probeneinbettung)
L	feldfreie Driftstrecke; Konfigurationen von Enantiomeren in der Fischer-Projektion (laevus: links)	NSGPx	Non-Selenium Glutathion-Peroxidase
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase	o	ortho
		O <sub>2</sub>	Sauerstoff
		ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrition
		Op.	Operation

oPA	o-Phtaldialdehyd	STPD	standard temperature pressure dry (Standardbedingungen für die Bestimmung von Gasvolumina: T = 273 K, P = 100 kPa [760 mmHg], Wasserdampfpartialdruck = 0 Pa)
ox	oxidiert	T	Totalacrylamidkonzentration, Temperatur
P	Propability, (Partial)Druck	t	Zeit
p	Partialdruck; Pico ( $10^{-12}$ )	$t_{1/2}$	(radioaktive) Halbwertszeit
Pa	Pascal (abgeleitete SI-Einheit des Drucks)	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	TG	Trockengewicht
PBP,	peptide-binding protein (auch: Grp)	THF	Tetrahydrofuran
PBS	phosphate buffered saline	TOF	Time of flight
PCr	Phosphokreatin	TrEMBL	Translated European Molecular Biology Laboratory(-Datenbank)
PEEP	positive endexpiratory pressure	Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-glycin
PET	Positronenemissionstomographie	Tris	Tris(hydroxymethyl)amminomethan
PGK2	Phosphoglyceratkinase 2	Triton <sup>®</sup>	Octophenolpoly(ethylenglycol-ether) <sub>n</sub> (nicht-ionisches Detergenz)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration	X-100	Poly(oxyethylen) <sub>n</sub> -sorbitanmonooleat (nicht-ionisches Detergenz)
pK	negativer dekadischer Logarithmus einer Dissoziationskonstanten	Tween <sup>®</sup>	20, 80
PMF	Peptide mass fingerprints	U	Unit (Einheit; z. B. im MnSOD-Assay); (Gleich-)Spannung
Po <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck	u	Unit (Einheit der atomaren Masse; $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg)
pO <sub>2</sub>	ebenfalls Sauerstoffpartialdruck	unv.	unverbunden (t-Test)
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase	V	Volt (Einheit der elektrischen Spannung)
Q	Ubichinon	v/v	Voluminaverhältnis
QH <sub>2</sub>	Ubichinol	V <sub>0</sub>	Wechselspannung
r	Korrelationskoeffizient; Feldradius	VEGF	vascular endothelial growth factor
R	Pyrimidin (A, G; z. B. in Primersequenzen); Rest (Strukturformeln)	verb.	verbunden (t-Test)
r <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß (quadrierter Korrelationskoeffizient)	VK	Variationskoeffizient
red	reduziert	vs.	versus
RNA	ribonucleic acid	W	weak (schwache Bindung zu A↔T; z. B. bei Primersequenzen); Watt (Einheit der elektrischen Leistung in Joule/s)
rpm	Rotationen pro Minute	w/v	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
RT	Raumtemperatur; reverse transcriptase	WT	Wildtyp
RTD-PCR	real time detection polymerase chain reaction	x	Variable (allgemeine Geradengleichung)
S	strong (starke Bindung zu G↔C; z. B. bei Primersequenzen); Schwefelatom	y	Variable (Geradengleichung); m/z bezogen auf die Carboxytermini (ESI-MS/MS-Spektrum)
s	Sekunde	αB-Krystallin	B-Kette des α-Krystallins
S <sub>0</sub>	„Fudge Factor“ bei der statistischen Auswertung → SAM	Δ	Delta (Unterschied); Delta Value → SAM; Positionsangabe in Strukturformeln
S <sub>1</sub>	2-Dimethylaminoethanol (DMAE, Beschleuniger für Probeneinbettung)	μ	Mikro ( $10^{-6}$ )
SAM	Significance Analysis of Microarrays	π	Pi (3,14159...)
SDMA	symmetrisches N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin	Σ	Sigma (Summenfunktion)
SDS	Sodiumdodecylsulfat	σ	Sigma (Standardabweichung)
SELDI	surface enhanced laser desorption ionisation	ω	Kreisfrequenz
SI	Spotintensität	Ω	Ohm (Einheit d. elektr. Widerstandes)
SIB	Schweizer Institut für Bioinformatik		
soxRS	superoxide response (regulon)		
SPECT	Single-Photon-Emissions-computertomographie		
STABW	Standardabweichung		

### 5.3 Chemikalien/Reagenzien

Sämtliche aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden nach Erfordernis in „pro analysi“- bzw. reinstmöglicher Qualität von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden **Am**
- Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA **Gi**
- Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland **Me**
- Promega, Madison, WI USA **Pr**
- SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland **Se**
- Sigma, St. Louis, MO USA **Si**

Der obige Zweibuchstabenkode für die einzelnen Bezugsquellen findet in der folgenden alphabetischen Auflistung Verwendung.

Aceton	Me	3-[(3-Cholamidopropyl)-	Si
Acetonitril (Acn)	Me	dimethyl-ammono]-1-	
Acrylamid/Bis-Monomer-Stock-	Gi	propansulfonat (CHAPS)	
lösung (30 %; Fertiglösung 29:1)		Coomassie-Brillantblau G 250	Se
Agarose Typ VII-A (low	Si	Coomassie-Brillantblau R 250	Si
gelling temperature)		Cytochrom c (Cyt c)	Me
Ameisensäure	Me	Diglycidyl Ether of	Si
Ammoniumcarbonat	Me	Polypropylene Glycol	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Me	(D.E.R 736; SPURR-KIT)	
Antifoam SO-25	Si	2-Dimethylaminoethanol	Si
L-Arginin	Si	(S <sub>1</sub> ; DMAE; SPURR-KIT)	
Borsäure	Me	asymmetrisches N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -	Si
Bromphenolblau	Si	Dimethyl-L-Arginin (ADMA)	
1-Butanol	Me	symmetrisches N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -	Si
iso-Butanol	Me	Dimethyl-L-Arginin (SDMA)	
Cacodylsäure Natriumsalz	Si	Dithiothreitol (DTT)	Am
(Cacodylat)		Essigsäure	Me
Calciumchlorid-Dihydrat	Me	Ethanol	Me

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Si	Phosphorsäure	Me
Formaldehyd	Me	Phosphorwolframsäure	Se
Glucose	Me	Poly(oxyethylen) <sub>n</sub> -sorbitan- monooleat (Tween <sup>®</sup> 20, 80)	Me
Glutaraldehyd	Si	Ponceau S	Me
Glycerin	Am	o-Pthaldialdehyd (oPA)	Si
Glycin	Am	Salzsäure	Me
Harnstoff	Am	Seifenlauge (Cleaning Solution)	Am
Iodacetamid	Si	bovines Serumalbumin	Si
IPG-Cover-Fluid	Am	Fraction V (BSA)	
IPG-Puffer	Am	Silbernitrat	Si
Kaliumchlorid	Me	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Am
Kaliumhydroxid	Me	Sucrose	Si
Kaliumphosphat	Si	5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	Me
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Me	Tetrahydrofuran (THF)	Si
2-Mercaptoethanol	Me	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Si
Methanol	Me	Toluidinblau O	Si
Methanol-LiChrosolv <sup>®</sup>	Me	Toluol	Me
Natriumcarbonat	Me	Tris(hydroxymethyl)- amminomethan (Tris)	Am
Natriumchlorid	Me	Trypsin	Pr
di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Me	Uranylacetat-Dihydrat	Se
Natriumdihydrogenphosphat- Dihydrat	Me	4-Vinylcyclohexene Dioxide	Si
Natriumhydrogencarbonat	Me	(ERL-4206; SPURR-KIT)	
Natriumsulfat	Me	Xanthin	Si
Natriumtetraborat (Borax)	Si	Xanthinoxidase	Si
Natriumthiosulfat	Me		
2-Nonenyl-1-succinic Anhydride (NSA; SPURR-KIT)	Si		
Octophenolpoly(ethylenglycol- ether) <sub>n</sub> (Triton <sup>®</sup> X-100)	Me		
Osmiumtetroxid	Se		
Pharmalyte pH 3-10 NL	Am		

## 5.4 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt R. A. Janosi stellvertretend für das an der Bereitstellung sämtlicher caninen Myokardproben beteiligte Team sowie C. Kirberich und D. Haubs für ihre professionelle Assistenz nicht nur Sachen 2D-PAGE. W. Schlack führte die Operationen an den Hunden durch.

Mit gutem Rat, aufwendiger Tat und/oder hilfreichen Korrekturvorschlägen für einzelne Textabschnitte standen darüber hinaus zur Verfügung: M. Reinartz (2D-PAGE); R. Hoffmann, Simon Lauter und S. Metzger (ESI-MS/MS einschließlich der Gerätebedingung); K. Zanger (Licht- u. Elektronenmikroskopie); A. Gödecke u. v. m. (Zucht der Myoglobin-Knockout-Mäuse).

Arnold Strauss vom "Department of Pediatrics" der Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA stellte freundlicherweise den polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit des murinen Mitochondrialen Trifunktionalen Proteins für eines der weiterführenden Experimente zur Verfügung.

Großteile dieser Arbeit wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Schr154 8-1) sowie das Biomedizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, ein zusätzliches Studiensemester für Forschungszwecke von der Studienstiftung des deutschen Volkes finanziell unterstützt.

G. Sauer war es, die mir weitaus länger als ursprünglich geplant den Schlüssel zu den Räumlichkeiten des Instituts für Herz- u. Kreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf warmhielt.

Abschließend möchte ich mich insbesondere noch bei T. Laussmann für das geduldige Einführen in die Proteomforschung und natürlich meinem Doktorvater U. K. M. Decking für das sofortige Einbinden in die von ihm geleitete Düsseldorfer Arbeitsgruppe sowie bei beiden für die außergewöhnlich (zeit)intensive Betreuung im Rahmen dieser Doktorarbeit bedanken.

## 5.5 Zusammenfassung

Der lokale myokardiale Blutfluss (MBF) variiert *in situ* mehr als zehnfach zwischen individuellen Herzarealen und weist dabei ein für mindestens 13 Tage stabiles, räumlich heterogenes Muster auf. Um die molekulare Basis dieses Phänomens zu untersuchen, wurde die lokale Proteinexpression von Niedrigfluss- und Hochflussarealen (NF versus HF  $\hat{=}$   $< 50\%$  versus  $> 150\%$  des mittleren MBF; Probentrockengewicht:  $59,4 \pm 19,4$  mg; je  $n=30$ ) aus 6 Beagle-Hunden einer 2D-PAGE-basierten Proteomanalyse unterzogen ( $380 \pm 79$  Spots/Gel). Ergänzend wurde ein Herz morphologisch (288 EM- [Mitochondrien] sowie 288 LM-Digitalphotos [Kapillaren]; je  $n=6$  Proben) untersucht. Während licht- u. elektronenmikroskopisch keine signifikanten Unterschiede nachweisbar waren, fand sich in NF-Arealen das Enzym  $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginin-Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) deutlich erhöht (+367%). Sein Substrat ADMA (asymmetrisches  $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginin), ein potenter Inhibitor aller NO-Synthaseisoformen, war deutlich reduziert (-75,4%). U. a. fanden sich in NF-Proben auch vermehrte Mengen zweier Glykolyseenzyme und Verringerungen zweier  $\beta$ -Oxidationsproteine. Den Unterschieden im MBF entsprechen demnach signifikante Änderungen in der lokalen Proteinexpression. In NF-Arealen führt dies vermutlich zu einer gesteigerten NO-Bildung sowie zu einem Shift von der  $\beta$ -Oxidation zur Glykolyse. Beide Änderungen mögen Ausdruck eines schützenden Homöostasemechanismus zur Kontrolle von  $O_2$ -Angebot und -Nachfrage sein.

In Mäusen mit gentechnologisch erzeugter Myoglobindefizienz ( $Myo^{-/-}$ ) werden Kompensationsmechanismen induziert, die für eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) nahezu gleichwertige Fertilität und Leistungsfähigkeit sorgen. Die Untersuchung derartig notwendiger Adaptationen liefert weiterführende Einblicke in die Funktion des Myoglobins (Mb). In einer Proteomanalyse (je  $n=12$  Mäuseherzen; je  $n=24$  Gele;  $461 \pm 22$  Spots/Gel) wurde daher nach weiteren Anpassungen an die Mb-Defizienz gesucht. In  $Myo^{-/-}$ -Herzen fanden sich 6  $\beta$ -Oxidationsproteine vermindert und 1 Glykolyseenzym verstärkt exprimiert. Weitere Veränderungen im  $Myo^{-/-}$  waren u. a.: Mangan-Superoxid-Dismutase -68,6% (Enzymaktivität: -34,2%); HSP74 +162,1%; Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1 -60,2%;  $\alpha$ B-Krystallin -38,4%. Die Beobachtungen legen nahe, dass  $Myo^{-/-}$ -Herzen den  $O_2$  durch einen Shift von der Fettsäure- zur Glucose-Oxidation energetisch effektiver nutzen und dass sich Stressreaktionen sowie Imitationen von Muskelfasertyp II-Eigenschaften vollziehen. Diese notwendigen Adaptationen untermauern die bedeutende Rolle des Mb's u. a. als  $O_2$ -Speicher sowie -Transporter und enthüllen erstmalig die Modulation der myokardialen Substratselektion durch Mb.

## 5.6 Publikationen

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Laussmann, T.; Janosi, R. A.; Fingas, C. D.; Schlieper, G. R.; Schlack, W.; Schrader, J. und Decking, U. K. Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition und enhanced glycolytic capacity in areas of low local blood flow. *FASEB J.* 16: 628-630. **2002.**
2. Decking, U. K.; Pai, V. M.; Bennett, E.; Taylor, J. L.; Fingas, C. D.; Zanger, K.; Wen, H. und Balaban, R. S. High-Resolution Imaging Reveals a Limit in the Spatial Resolution of Blood Flow Measurements by Microspheres. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* **2004.**
3. Flogel, U.; Laussmann, T.; Godecke, A.; Abanador, N.; Schafers, M.; Fingas, C. D.; Metzger, S.; Levkau, B.; Jacoby, C. and Schrader, J. Lack of myoglobin causes a switch in cardiac substrate selection. *Circ.Res.* 96: e68-e75, **2005**

## 5.7 Curriculum vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname: Fingas, Christian Dominik  
Geburtsdatum: 13. Februar 1978  
Geburtsort: Trier, Deutschland  
Nationalitäten: Deutsch, luxemburgisch  
Familienstand: Ledig



### AUSBILDUNG

1984 – 1988: Keune-Grundschule, Trier  
1988 – 1997: Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Trier; Abitur: 1997  
1997 – 1998: Wehrdienst, Sanitätsbataillon, Rennerod  
1998 – 2004: Studium der Humanmedizin, HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF; 3. Staatsexamen: 2004  
2001 – 2002: Famulaturen: Praxis für Chirurgie, Udine, Italien; Division of Endocrinology and Metabolism, Georgetown University Hospital, Washington, D.C., USA; Famulaturen in Gynäkologie und Pädiatrie im Mutterhaus Trier  
2003/2004: Praktisches Jahr am UNIVERSITÄTSKLINIKUM DÜSSELDORF (Wahlfach Anästhesiologie)  
19.01.2005: Approbation

### TÄTIGKEITEN & AUSZEICHNUNGEN

1997: 1. Preis „JUGEND FORSCHT - CHEMIE“  
2000 – 2004: Stipendium der „STUDIENSTIFTUNG DES DEUTSCHEN VOLKES“  
2000 – 2005: Doktorand: Proteomforschung, Institut für Herz- u. Kreislaufphysiologie, HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF  
ab 04/2005: Assistenzarztstelle für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie unter C. E. Broelsch, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ESSEN  
ab 04/2006: Forschung: Experimentell chirurgische Tätigkeit in den Arbeitsgruppen „Lebertransplantation und Perfusionslösungen“ sowie „Regeneration von Lebergewebe nach Resektion und partieller Lebertransplantation“, Institut für Physiologische Chemie, UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN

### SPRACHEN

Deutsch: Muttersprache  
Englisch: Flüssig in Schrift und Sprache  
Französisch / Italienisch: Schrift und Sprache

Essen, 01. July 2006