

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Benedikt Pannen

Protektive Mechanismen der ischämischen
Präkonditionierung bei einer an der Rattenleber induzierten partiellen
Leberischämie mit Reperfusion:
Expressionsveränderungen hepatischer zytosolischer Proteine im sauren
pH-Bereich

Dissertation

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

vorgelegt von
Simon Weidhaas
2018

Referenten

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Inge Bauer (Klinik für Anästhesiologie)

Zweitgutachter: PD Dr. Florian Simon (Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie)

Die Studie wurde gefördert durch die Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Fördernummer: 06/2010: *Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and ischemic preconditioning: regulation of expression of proteins, protein modifications and microRNAs*).

Die vorliegende Arbeit ist ein Teilprojekt der zuvor genannten Studie.

Zusammenfassung

Fragestellung: Ein Ischämie-Reperfusionsschaden (IR-) führt bei chirurgischen Lebereingriffen häufig zu einer Organdysfunktion. Eine ischämische Präkonditionierung (IPC) durch kurzzeitige ischämische Episoden kann vor diesem Schaden schützen. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieses Phänomens sind nur teilweise erforscht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem globalen proteomanalytischen Ansatz Proteine zu detektieren und zu identifizieren, die bei der hepatischen IPC in ihrer Expression verändert werden.

Methodik: Männliche Wistar-Ratten wurden in 6 Behandlungsgruppen randomisiert (je n=6). Die Entnahme von Lebergewebe erfolgte zu 2 Zeitpunkten. Es wurde eine IPC durch 10-minütige 70%ige Leberischämie gefolgt von 10 Minuten Reperfusion induziert mit Probenentnahme nach 20 Minuten (IPC20). Zudem erfolgte eine Entnahme nach 140 Minuten (IPC140). Andere Tiere wurden einer IPC unterzogen, der sich 60 Minuten partielle Ischämie und 60 Minuten Reperfusion anschlossen (IPC-IR). Eine Behandlungsgruppe wurde 60 Minuten Ischämie gefolgt von 60 Minuten Reperfusion ohne vorherige IPC ausgesetzt (IR). Scheinoperierte Tiere dienten als Kontrollen. Die Organentnahme erfolgte nach 20 bzw. 140 Minuten (SHAM20 und SHAM140). Das Ausmaß der Organschädigung wurde anhand der Plasma-Transaminasenlevel beurteilt. Zur Detektion und Identifikation differentiell exprimierter hepatischer Proteine wurde eine vergleichende Proteomanalyse in Kombination aus 2-dimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie durchgeführt. Die Methodik zur Proteinauftrennung wurde probenspezifisch optimiert. Bestehende Protokolle wurden modifiziert. Die Proteinexpressionsprofile der verschiedenen Behandlungsgruppen wurden softwarebasiert ausgewertet und verglichen. Differentiell exprimierte Proteinspots ($p < 0,03$) wurden massenspektrometrisch identifiziert. Im Speziellen wurde die zytosolische Proteinfraction im pH-Bereich 4-7 untersucht.

Ergebnisse: Die IPC führte zu einer signifikanten Reduktion der Transaminasenlevel nach IR. Ein Protokoll zur reproduzierbaren Auftrennung des Subproteoms wurde etabliert. Es wurden 8 differentiell exprimierte Proteinspots detektiert, 2 beim Vergleich von IPC-IR mit IPC140, 4 beim Vergleich von IPC140 mit IPC20, 1 beim Vergleich von IPC20 mit SHAM20, 1 beim Vergleich von IPC140 mit SHAM140 sowie SHAM140 mit SHAM20. Von diesen ließen sich 4 eindeutig identifizieren (Protein SEC 13 homolog, *Programmed cell death 6 interacting* Protein IPC140/IPC20, *Heat Shock Protein 60* SHAM140/SHAM20, Sarkosindehydrogenase IPC20/SHAM20). Bei 2 weiteren (Tubulin IPC-IR/IPC140 und Aktin IPC140/IPC20) ließ sich der genaue Subtyp des Proteins nicht bestimmen. Die meisten Proteomveränderungen zeigten sich im Verlauf der IPC (IPC20/IPC140). Das Spektrum umfasst Proteine mit Chaperon-, Struktur-, Metabolismus- oder Transportfunktion.

Schlussfolgerung: (1) Eine probenspezifische Anpassung der Proteinauftrennungsmethodik ist unerlässlich bei einem globalen explorativen Ansatz. (2) Es wurden neue sowie im Rahmen der IPC bereits beschriebene Proteine identifiziert, die sich in den Kontext der IPC einordnen lassen. (3) Der operative Eingriff alleine führt bereits zu Proteomveränderungen. (4) Es bedarf weiterer Studien, um die funktionelle Bedeutung der Regulation der Proteine und deren klinische Nutzbarkeit zu ergründen.

Abstract

Introduction: Ischemia-Reperfusion (IR) damage is a common cause of liver dysfunction during hepatic surgery and transplantation. Ischemic preconditioning (IPC) is known to ameliorate the damage caused by IR. However, the underlying molecular mechanisms are yet to be fully disclosed. The aim of this study was to detect proteins with altered expression in hepatic IPC by using a global proteomic approach.

Methods: Male Wistar-rats were randomized into 6 groups (n=6). Liver tissue samples were obtained at 2 different points. IPC was induced by 10 minutes of 70% hepatic ischemia followed by 10 minutes of reperfusion. Samples were taken after 20 minutes (IPC20). Other samples were taken 140 minutes after IPC (IPC140). Furthermore, IPC treated animals were subjected to 60 minutes of partial ischemia and 60 minutes of reperfusion (IPC-IR) while another group underwent IR without preceding IPC (IR). Controls were taken after 20 and 140 minutes (SHAM20 and SHAM140). Liver damage was evaluated by plasma aminotransferase levels. A combination of 2-dimensional gelelectrophoresis and mass spectrometry was used to detect and identify differentially expressed proteins. The procedure of protein separation was optimized. Established protocols were modified. Protein expression profiles of the samples were obtained and compared by software. Differentially expressed proteins ($p < 0,03$) were identified using mass spectrometry. Specifically, the cytosolic protein fraction (pH 4-7) was examined in this study.

Results: IPC significantly reduced plasma aminotransferase levels after IR. A reproducible, sample specific protocol for protein separation of the subproteome has been established. 8 differentially expressed protein spots were detected. 2 comparing IPC-IR with IPC140, 4 in IPC140/IPC20, 1 in IPC20/SHAM20, 1 in IPC140/IPC20 and in SHAM140/SHAM20. 4 proteins were definitely identified (Protein SEC 13 homolog, programmed cell death 6 interacting protein IPC140/IPC20, heat shock protein 60 SHAM140/SHAM20, sarcosine dehydrogenase IPC20/SHAM20). In 2 spots the exact subtype could not be clearly determined (tubulin IPC-IR/IPC140 and actin IPC140/IPC20). Most proteome alterations were detected comparing IPC140 with IPC20. Differentially expressed proteins included chaperones, proteins involved in cell structure, metabolism or intracellular transport.

Conclusion: (1) A sample specific adjustment of separation procedures is crucial in a comparative proteomic analysis. (2) New proteins in the IPC context as well as known mediators of IPC were detected. (3) Laparotomy alone for sample obtainment causes proteome alterations. (4) Further studies are necessary in order to elucidate the functional role of the described proteins in IPC.

Abkürzungen

2-DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
A	Ampere
A2aR	Adenosin A2 Rezeptor
ACN	Acetonitril
ALT	Alaninaminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Proteinkinase
ANP	atriales-natriuretisches-Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aspartataminotransferase
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	Cholamidopropyldimethylammonio-propansulfat
cm	Zentimeter
CO	Kohlenmonoxid
COP	<i>coat protein complex</i>
Cu	Kupfer
Cyt	zytosolische Zellfraktion
D	Dalton
DIGE	differenzielle-Gelelektrophorese
DS	differentieller (Protein-) <i>spot</i>
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle
EGTA	Ethylenglykol-Tetraessigsäure
ENTPD5	Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
ESI-Qq-TOF	<i>Electrospray-Ionisation Quadrupol-Quadrupol Time-of-Flight</i>
ET	Endothelin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GMS-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
G-Protein	Guaninnukleotid bindendes Protein
G _i -Protein	inhibierendes G-Protein
G _s -Protein	Adenylatzyklase aktivierendes G-Protein
H	Wasserstoff
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HepG2	humane Hepatomazelllinie
HIF	<i>hypoxia-inducible-factor</i>
HO	Hämoxygenase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HSF	<i>Heat shock Factor</i>
HSP	<i>Heat shock Protein</i>
IAA	Iodacetamid
iCAM	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IEF	isoelektrische Fokussierung
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IR	Ischämie Reperfusion
IRE	<i>inositol requiring enzyme</i>
K	Kalium
KC	Kupfferzelle
kDa	Kilodalton
kVh	Kilovoltstunden
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LR	Leberteilresektion
LTx	Lebertransplantation
M	Molar
m	Masse
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	<i>myocyte specific enhancer factor</i>
Mem	membranöse Zellfraktion
mg	Milligramm
Mi	mitochondriale Zellfraktion
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaCO ₃	Natriumcarbonat
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NU	nukleäre Zellfraktion
O	Sauerstoff
P	Proteinpellet
PAA	Polyacrylamid
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PDCD6IP	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>
PDI	Protein-Disulfidisomerase
PERK	<i>PKR-like ER-Kinase</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PK	Proteinkinase
PL	Phospholipase

PVDF	Polyvinylidenfluorid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor
RBP	Retinol-bindendes-Protein
rIPC	<i>remote ischemic preconditioning</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SarDH	Sarkosindehydrogenase
SDS-PAGE	<i>sodium-dodecyl-sulfat-polyacrylamide-gelelektrophoresis</i>
SHAM	scheinoperierte Kontrollgruppe
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UDP	Uracildiphosphat
ÜS	Überstand
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UPR	<i>unfolded protein response</i>
µg	Mikrogramm
V	Volt
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
vgl.	vergleiche
XDH	Xanthindehydrogenase
XOD	Xanthinoxidase

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ischämie- Reperfusion bei Lebereingriffen	1
1.2	Signalwege beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber	1
1.3	Induktion von Gewebstoleranz durch ischämische Präkonditionierung	4
1.4	Präkonditionierung von Lebergewebe	7
1.4.1	Ischämische/mechanische Präkonditionierung an der Leber	7
1.4.2	Pharmakologische hepatische Präkonditionierung	8
1.4.3	Signalwege der hepatischen Präkonditionierung	9
1.5	Proteinanalytische Untersuchung der Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung	13
1.5.1	Proteomics	13
1.5.2	Komparative Proteomanalyse	13
1.5.3	Das Leberproteom	16
1.5.4	Proteomanalytische Studien im Rahmen hepatischer ischämischer Präkonditionierung und Ischämie-Reperfusionsschaden	16
1.6	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien und Geräte	20
2.2	Tiermodell	20
2.2.1	Genehmigung	20
2.2.2	Versuchstiere	20
2.2.3	Versuchsprotokoll und Organentnahme	21
2.3	Verarbeitung der Organproben	23
2.3.1	Homogenisierung	23
2.3.2	Gewebefraktionierung	24
2.3.3	Proteinbestimmung	25
2.4	Evaluierung der Proteinfraktionierung durch Western Blot Analyse	26
2.5	Auftrennung des zytosolischen Proteoms im sauren pH-Bereich	31
2.5.1	Proteinfällung	31
2.5.2	Rehydrierung	32
2.5.3	2-Dimensionale Gelelektrophorese	33
2.5.4	Coomassie Färbung	35
2.6	Einscannen der Gele	36
2.7	Analyse differentiell exprimierter <i>spots</i>	37
2.8	Tryptischer Verdau und massenspektrometrische Identifizierung der Protein- spots	38

2.8.1	Tryptischer im-Gel-Verdau	38
2.8.2	Entsalzen der Peptide	40
2.8.3	Electrospray Ionisations Massenspektrometrie	40
2.8.4	Proteinidentifikation.....	41
3	Ergebnisse	44
3.1	Quantifizierung der Leberschädigung anhand der Transaminasen	44
3.2	Western Blots zur Überprüfung des Fraktionierungsprotokolls.....	44
3.3	Optimierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese	45
3.3.1	Optimierung der 1. Dimension.....	45
3.3.2	Optimierung der 2. Dimension.....	46
3.4	Detektion differentiell exprimierter <i>spots</i>	47
3.5	Massenspektrometrisch identifizierte Proteine	53
4	Diskussion und Ausblick	56
4.1	Studiendesign und Methodik, Limitationen	57
4.2	Einordnung der differentiellen Proteine in den Kontext der ischämischen Präkonditionierung	62
4.3	Konklusion und Ausblick	70
5	Literatur	72
6	Anhang	86
7	Danksagung	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stammlösung, Proteaseninhibitoren, Lysispuffer I.....	24
Tabelle 2: Lysispuffer II	24
Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen der Proteinbestimmung nach Lowry.....	26
Tabelle 4: Fraktionsspezifische Antikörper	27
Tabelle 5: Zusammensetzung von zwei 11% PAA Trenngelen	27
Tabelle 6: Zusammensetzung von zwei 5%igen Sammelgelen.....	28
Tabelle 7: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers	28
Tabelle 8: Zusammensetzung des Ladepuffers.....	29
Tabelle 9: Western Blot Puffer.....	29
Tabelle 10: <i>Tris-buffered Saline (TBS) Tween-Lösung, Blocking solution</i>	30
Tabelle 11: Peroxidase-gebundene Antikörper	31
Tabelle 12: Rehydrierungspuffer	32
Tabelle 13: Zusammensetzung Äquilibrationpuffer	34
Tabelle 14: Agaroselösung.....	35
Tabelle 15: Coomassie Färbelösung	36
Tabelle 16: Entfärbelösung.....	36
Tabelle 17: Vergleiche zwischen den Gruppen	37
Tabelle 18: Trypsinverdau, Puffer und Lösungen.....	38
Tabelle 19: Entsalzungslösungen.....	40
Tabelle 20: Differentiell exprimierte Proteinspots	49
Tabelle 21: Identifizierte Proteine	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen des hepatischen IR-Schadens	4
Abbildung 2: Mechanismen der hepatischen IPC.....	12
Abbildung 3: Proteinverteilung nach <i>pI Homo Sapiens</i>	15
Abbildung 4: Versuchsprotokoll	21
Abbildung 5: Schema der differentiellen subzellulären Fraktionierung	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung Western Blot	30
Abbildung 7: Isoelektrische Fokussierung	33
Abbildung 8: Nomenklatur der Peptidfragmente nach Roepstorff und Fohlman.....	42
Abbildung 9: Darstellung der Transaminasen Level	44

IV

Abbildung 10: Zusammenfassung Western Blot Ergebnisse.....	45
Abbildung 11: Anpassung des IEF Protokolls.....	46
Abbildung 12: Proteinauftrennung bei unterschiedlichen PAA-Konzentrationen zur Optimierung der 2-DE Gele.....	47
Abbildung 13: Übersicht differentiell exprimierter <i>spots</i>	49
Abbildung 14: Differentieller <i>spot</i> 1.....	50
Abbildung 15: Differentieller <i>spot</i> 2.....	50
Abbildung 16: Differentieller <i>spot</i> 3.....	51
Abbildung 17: Differentieller <i>spot</i> 4.....	51
Abbildung 18: Differentieller <i>spot</i> 5a.....	51
Abbildung 19: Differentieller <i>spot</i> 5b.....	52
Abbildung 20: Differentieller <i>spot</i> 6.....	52
Abbildung 21: Differentieller <i>spot</i> 7.....	52
Abbildung 22: Differentieller <i>spot</i> 8.....	52

1 Einleitung

1.1 Ischämie- Reperfusion bei Lebereingriffen

Eine Ischämie mit Reperfusion (IR) verursacht durch Minderdurchblutung und anschließendes Wiedereinsetzen der Durchblutung Schaden an einem Gewebe. Dieser Schaden stellt eine bedeutende Ursache für eine Organdysfunktion nach operativen Eingriffen an der Leber dar (1,2).

Eingriffe, die mit IR einhergehen, umfassen hauptsächlich Leberteilresektionen (LR), die meist aufgrund von malignen Prozessen durchgeführt werden oder Lebertransplantationen (LTx). Es existiert ein großer Mangel an Spenderorganen, was dazu führt, dass vermehrt auch Organe für LTx rekrutiert werden, die aufgrund von Steatose oder anderen Integritätsdefiziten nicht optimal geeignet sind. Diese Organe sind weitaus anfälliger für IR als gesunde (3).

Bei Leberischämie im Rahmen von LTx wird zwischen warmer und kalter Ischämie unterschieden. Bei der „warmen Ischämie“ ist das Organ *in situ* belassen und die Ischämie ereignet sich bei Körpertemperatur. "Kalte Ischämie" beschreibt die Unterbrechung der Blutversorgung während der Transplantation. Unter der "kalten Ischämiezeit" versteht man die Zeit von der Organentnahme beim Spender bis zur Implantation beim Empfänger. Während dieser Zeit ist das Organ gekühlt (4,5). Es ist anzunehmen, dass bei den beiden Ischämieformen und der folgenden Reperfusion unterschiedliche Mechanismen zum Leberschaden führen (4,6,7).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Lebergewebe männlicher Wistar-Ratten untersucht, die einer partiellen warmen Leberischämie unterzogen wurden.

1.2 Signalwege beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber

Längere Ischämiezeiten und die konsekutive Reperfusion führen an der Leber zu Schäden. Hierbei kommt es zur Aktivierung verschiedener proinflammatorischer Signalwege. Aufgrund der Komplexität der Mechanismen werden hier nur die grundlegenden und etablierten Konzepte beschrieben.

Ein IR-Schaden entsteht sowohl durch die Ischämie als auch durch die Reperfusion, das Wiedereinsetzen der Durchblutung.

In Abbildung 1 sind wesentliche Mechanismen zusammengefasst. Die Ischämie führt zu einem Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) sowie zu einer Verschiebung des Konzentrationsgradienten von Natrium, Calcium und Protonen (8). Das wiederum führt über aktivierte hydrolytische Enzyme zum Anschwellen der sinusoidalen Endothelzellen und Kupfferzellen (ortsständige Makrophagen der Leber) (8). Auch die Hepatozyten schwellen infolge von IR oder anderen Formen von Stress an (9,10). Kupfferzellen tragen zum IR-Schaden bei, indem sie sowohl Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) als auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen (11). Aus aktivierten Endothelzellen und Hepatozyten werden ROS durch eine erhöhte Aktivität der Xanthinoxidase (XOD) freigesetzt (4,12). ROS aus inhierten Mitochondrien der Zellen sind Hauptinitiatoren von oxidativem Stress (13). Oxidativer Stress entsteht dadurch, dass den hohen Konzentrationen an ROS ein vermindertes antioxidatives Schutzsystem wie Glutathion oder Superoxiddismutase gegenübersteht (2,4,13).

Ein weiterer Mechanismus, der zum IR-Schaden beiträgt, ist ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatatorischem Stickstoffmonoxid (NO) und dem vasokonstriktorischem Peptidhormon Endothelin-1 (ET-1) (4). Auch die Konzentration des vasodilatatorischen Kohlenmonoxid (CO) ist bedeutsam (14,15).

Das Ungleichgewicht von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren sowie ein Anschwellen der Endothel- und Kupfferzellen führen zu einer Verengung der Kapillaren, was wiederum eine Störung der Mikrozirkulation zur Folge hat (4,8).

Die Zirkulationsstörung trägt zu einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten bei. Die von den Kupfferzellen sekretierten Zytokine TNF- α und IL-1 aktivieren *cluster of differentiation 4* (CD4)-positive T-Helferzellen, welche wiederum *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GMS-CSF), Interferon gamma (INF- γ) und TNF- β produzieren. Dies führt zur weiteren Einwanderung von Neutrophilen (4,8,12,16). Die freigesetzten Zytokine führen zu einer Aktivierung von interzellulären Zelladhäsionsmolekülen (ICAM) und vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAM), die auf Granulozyten und Endothelzellen lokalisiert sind. Dadurch wird die Akkumulierung und Anhaftung von Granulozyten verstärkt, welche durch Freisetzung von ROS und Proteasen zu weiterem Parenchymschaden beitragen (8,12,16).

Oxidativer Stress wird durch Veränderungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, den Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor (PPAR) γ , Adiponektin sowie Retinol-bindendes-Protein 4 (RBP 4), verstärkt (4,17).

Platelet activating factor (PAF) verstärkt die Freisetzung von ROS aus neutrophilen Granulozyten. Auch das Arachidonsäurederivat Leukotrien B₄ spielt eine Rolle bei der leukozytären Antwort (4,8,12,16).

IR führt ferner zu einer Störung der Proteinintegrität im Endoplasmatischen Retikulum (ER), dem sogenannten "*misfolding*". Die Proteine erhalten nicht ihre Quartärstruktur. Dies führt zur *unfolded protein response* (UPR) (4,18,19), was letztlich Apoptose und Nekrose bewirkt. Außerdem spielen *toll-like* Rezeptoren (TLR), insbesondere TLR-4, eine wichtige Rolle bei der entzündlichen Reaktion, die durch IR hervorgerufen wird (4,20,21).

Der IR-Schaden hat einen biphasischen Verlauf. Die initiale Ischämiephase führt zu einem lokal gestörten Metabolismus durch Sauerstoffmangel und ATP-Depletion, was einen parenchymalen Zellschaden verursacht. Mit der konsekutiven Reperfusion schließt sich eine zytotoxische Phase mit inflammatorischer Immunreaktion an, die aus direkten und indirekten zytotoxischen Mechanismen besteht (12,21).

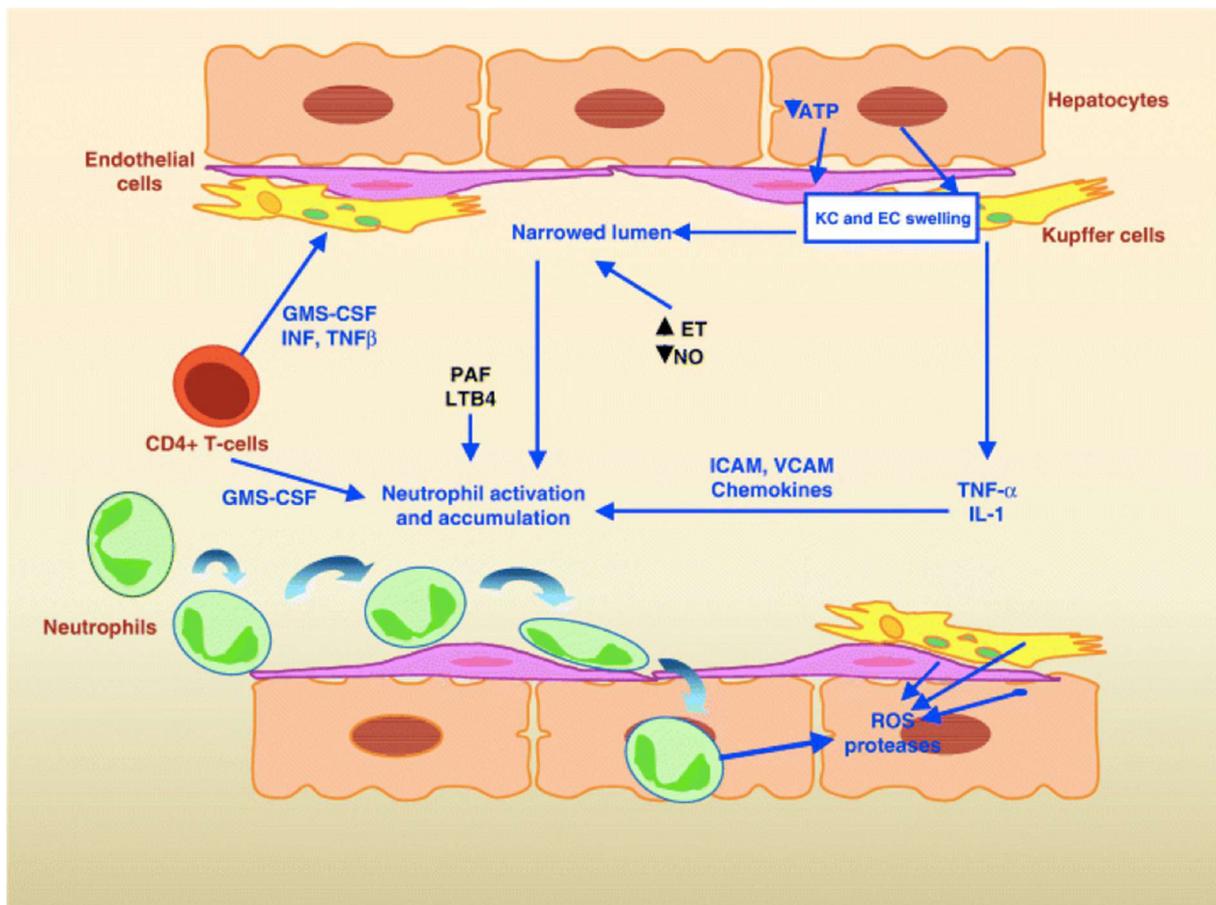


Abbildung 1: Mechanismen des hepatischen IR-Schadens (8). Infolge von ATP-Mangel kommt es zu einem Anschwellen der Kupfer- und Endothelzellen. Ein Ungleichgewicht an NO und ET führt zu einer Vasokonstriktion. Kupferzellen und aktivierte CD4+ Zellen schütten Zytokine und GMS-CSF aus. Neutrophile Granulozyten akkumulieren infolge dessen und verursachen erhöhte Konzentrationen und Aktivität von ROS und Proteasen. Es kommt zu einer Schädigung des Lebergewebes. ATP= Adenosintriphosphat; KC= Kupferzelle; EC= Endothelzelle; GMS-CSF= *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*; INF= Interferone; TNF= Tumornekrosefaktor; ET= Endothelin; NO= Stickstoffmonoxid; PAF= *Platelet activating factor*; LTB4= Leukotrien B4; ICAM= interzelluläres Zelladhäsionsmolekül; VCAM= vaskuläres Zelladhäsionsmolekül; IL-1= Interleukin 1; ROS= reaktive Sauerstoffspezies

Aufgrund der klinischen Relevanz eines IR-Schadens bedarf es der Entwicklung von Strategien zum Gewebeschutz. Zu diesen Strategien zählt die Ischämische Präkonditionierung (IPC). Seit mehr als 15 Jahren ist bekannt, dass man durch präventive Maßnahmen wie IPC und andere präkonditionierende Methoden die Leber vor IR-Schaden schützen kann (22–25).

1.3 Induktion von Gewebstoleranz durch ischämische Präkonditionierung

IPC ist ein Verfahren, bei dem Gewebe durch einen oder mehrere Zyklen kurzzeitiger Ischämie mit Reperfusion auf einen späteren ischämischen Insult und

Reperfusionsschaden vorbereitet wird. Erstmals beschrieben wurde das Phänomen 1986 durch Murry *et al.* am Herzen. Murry und Mitarbeiter zeigten im Hundemodell, dass der sequenzielle Verschluss eines Koronargefäßes (vier mal fünf Minuten Ischämiezeit gefolgt von jeweils fünf Minuten Reperfusion) bei einer anschließenden Ischämiezeit von 40 Minuten, die Infarktgröße um 75% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe reduzieren konnte. Die Autoren prägten den Begriff der "ischämischen Präkonditionierung", weil es gelungen war, an Herzgewebe durch kurze subletale ischämische Stimuli eine Toleranz gegen einen folgenden, stärkeren Insult zu induzieren (26).

In weiteren Studien an anderen Spezies ließ sich der Effekt ebenfalls nachweisen (27,28). Auch beim Menschen konnten in klinischen Studien schützende Effekte der IPC am Herzen gezeigt werden (29,30).

Der protektive Effekt der IPC lässt sich auch durch diverse andere Methoden erreichen. So erzielen volatile Anästhetika und andere Pharmaka wie beispielsweise Opiode Ähnliches am Myokard (31,32). Auch durch die vorübergehende Okklusion der Perfusion von Extremitäten, was als *remote ischemic preconditioning* (rIPC) bezeichnet wird, wird ein protektiver Effekt am Herzen hervorgerufen (33,34).

Von IPC profitieren auch andere Gewebetypen als das Herz. So konnte zum Beispiel in verschiedenen Tier- oder Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass Skelettmuskulatur (35), Netzhaut (36), Nierenparenchym (37) oder Leber (22) durch Präkonditionierung gegen IR-Schäden geschützt werden können.

Am Herzen existieren zwei Phasen der IPC, das "*early preconditioning*" und eine verzögerte, abgeschwächte Wirkung, die als "*delayed preconditioning*" bezeichnet wird (38).

Die Dauer der präkonditionierenden Ischämie am Herzen scheint zudem eine wichtige Rolle zu spielen. So hat eine Phase von drei bis fünf Minuten Ischämie, gefolgt von fünf Minuten Reperfusion einen schützenden Effekt (26), während kürzere Präkonditionierungsphasen das Infarktareal am Herzen nicht reduzieren konnten (39).

Es wurden in über 30 Jahren Forschung seit der Erstbeschreibung des Konzeptes der IPC durch Murry und Mitarbeiter viele molekulare Mechanismen beschrieben, die

bei diesem Phänomen eine Rolle spielen. Eisen *et al.* haben in einem Übersichtsartikel sowohl molekulare Mediatoren als auch Effektoren der Präkonditionierung am Herzen zusammengefasst (40).

Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die Adenosinkonzentration in kardialen Myozyten bei kurzen Ischämieperioden ansteigt (39,41,42). Das vasoaktive Oligopeptid Bradykinin sowie δ -Opioid Rezeptoren könnten ebenfalls eine wichtige Rolle bei der IPC spielen (39,43). Weitere als Auslöser oder Mediatoren der kardialen IPC diskutierte Substanzen sind Prostaglandine, NO, Calcium und geringe Mengen an ROS (44–48).

Adenosin scheint intrazellulär vor allem ATP-abhängige Kalium (K^+)-Kanäle sowie Proteinkinase C (PKC) zu modulieren und dadurch zum Präkonditionierungsmechanismus beizutragen (49,50).

Early preconditioning basiert überwiegend auf der Aktivierung und Regulierung von bereits vorhandenen Proteinen auf posttranslationaler Ebene, während beim *delayed preconditioning* Proteine neu synthetisiert und in ihrer Expressionsstärke verändert werden (51).

Beim Menschen konnte IPC am Herzen erfolgreich angewandt werden. Jenkins *et al.* zeigten dies in einer randomisierten, kontrollierten, klinischen Studie mit 33 Patienten. Die Patienten wurden einer koronaren *Bypass* Operation bei Drei-Gefäß-Koronarer-Herzkrankheit unterzogen. Im Plasma präkonditionierter Patienten waren postoperativ die Troponin T-Level signifikant niedriger verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (52).

Wie IPC scheint auch rIPC beim Menschen sowohl bei akuten ischämischen Ereignissen (Infarkt, instabile *Angina Pectoris*) (53) als auch bei elektiven Eingriffen einen positiven Effekt zu haben (33). Neuere Erkenntnisse stellen den Nutzen von rIPC bei kardiochirurgischen Eingriffen allerdings in Frage (54,55).

1.4 Präkonditionierung von Lebergewebe

Wie oben erwähnt, lässt sich IPC auch bei anderen Organen als dem Herzen anwenden. Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit wird im Folgenden auf die Präkonditionierung von Lebergewebe eingegangen.

Theodoraki *et al.* haben in einem Übersichtsartikel Präkonditionierungsmethoden von hepatischem Gewebe zusammengefasst (56).

Als Parameter für einen hepatoprotektiven Effekt wurde bei den meisten Studien eine Reduktion der Plasmaaktivitäten der Transaminasen Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT) herangezogen. Diese werden beim Untergang von Lebergewebe freigesetzt. In einigen Studien wurden Laktatdehydrogenase- (LDH) Konzentrationen gemessen, Überlebensvorteile beobachtet oder Apoptose- und Nekroseraten begutachtet.

An der Leber ist es, ähnlich wie am Herzen, möglich, sowohl mechanisch (durch Kompression der versorgenden Gefäße) als auch pharmakologisch zu präkonditionieren (25,56). Darüber hinaus gibt es Untersuchungen zu rIPC, die bei Ratten einen protektiven Effekt durch vorübergehende Okklusion von Extremitäten zeigte (57). Eine weitere untersuchte Methode ist die sogenannte hypertherme Präkonditionierung. Dabei wurden Versuchstiere vor IR einer Umgebungstemperatur von 42 °C ausgesetzt. Dies hatte bei der Ratte ebenfalls eine präkonditionierende Wirkung gegen IR-Schaden der Leber (58).

1.4.1 Ischämische/mechanische Präkonditionierung an der Leber

Bei der hepatischen IPC, der mechanischen Präkonditionierung der Leber, wird die Blutversorgung des Leberparenchyms durch Aufsatz einer Gefäßklemme (*clip*) auf die versorgenden Gefäße für kurze Zeit unterbunden. Meist wird das *ligamentum hepatoduodenale* für 10-15 Minuten abgeklemmt, wobei der *ductus choledochus* möglichst ausgespart werden sollte, um den Abfluss der Gallenflüssigkeit zu gewährleisten. Das Procedere leitet sich vom Pringle Manöver (59) ab. Dieses Manöver ist nach dem Chirurg James Hogarth Pringle benannt, der 1908 zeigte, dass sich Leberblutungen mittels Unterbindung der Blutzufuhr durch Aufsatz eines *clips* auf das *ligamentum hepatoduodenale* kontrollieren lassen. Bis dahin war man der Meinung, dass eine Okklusion dieser Strukturen zum Tod führt. Pringle konstatierte, dass auf diese Weise die hepatische Blutzufuhr risikolos bis zu einer

Stunde unterbrochen werden konnte. Das Pringle Manöver findet heute regelmäßig Anwendung in der Leberchirurgie.

Bei der IPC an der Leber wird im Sinne eines Pringle Manövers der Blutfluss zur Leber kurzfristig vermindert.

Darüber hinaus bedienen sich manche Studien der *selective hepatic vascular exclusion* (60). Dies ist ein Verfahren, bei dem selektiv sowohl der arterielle und portalvenöse Blutfluss zur Leber hin als auch der venöse Abfluss von der Leber weg, in die *vena cava*, unterbunden werden (61). Auch diese Methode kommt aus der Leberchirurgie und dient dazu, große Blutverluste zu vermeiden.

In den meisten experimentellen und klinischen Studien wurden 5-10 Minuten Ischämie gefolgt von ebenfalls 5-10 Minuten Reperusionszeit als IPC-Protokoll angewandt (62–68).

Im Ratten- und im Schweinemodell wurde auch ein intermittierendes Präkonditionierungsverfahren verwendet, bei dem konsekutive, kurze Ischämie- und Reperfusionsepisoden hintereinander appliziert werden. Dieses Verfahren wird als *intermittent inflow occlusion* bezeichnet und mildert ebenfalls IR-Schaden ab (69–71). Ob IPC oder *intermittent inflow occlusion* effektiver ist, wird kontrovers diskutiert. Kadono *et al.* konnten im Schweinemodell eine Überlegenheit von IPC, im Sinne niedrigerer TNF- α - und ET-1-Produktion zeigen (70). Der kumulative Gallenfluss nach Ischämie zeigte sich in einer anderen Studie nach Präkonditionierung durch *intermittent inflow occlusion* im Schweinemodell bei langer anschließender Ischämiezeit (200 Minuten) im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu unbeeinflusst (69). Schiesser *et al.* zeigten im Rattenmodell eine Überlegenheit von *intermittent inflow occlusion* gegenüber IPC bei älteren Tieren gemessen an der Gallenflussrestitution nach Ischämie (71).

1.4.2 Pharmakologische hepatische Präkonditionierung

Am Herzen können pharmakologische Wirkstoffe, wie beispielsweise volatile Anästhetika einen ähnlich ausgeprägten Schutzeffekt wie die mechanische Präkonditionierung hervorrufen (31). Daher stellt sich die Frage, ob dies auch an der Leber möglich ist.

Es wurde eine Reihe von Substanzen in unterschiedlichen Studien getestet. Bereits 1994 stellten Vriens *et al.* die Hypothese auf, dass sich hepatischer IR-Schaden bei der Resektion von Lebermetastasen durch Vorbehandlung mit Allopurinol abmildern

lässt. Dies bestätigte sich jedoch nicht (72). Bei Behandlung mit Methylprednisolon vor Leberoperationen zeigte sich, dass IL-6-Level sowie Transaminasen niedriger waren als in der Kontrollgruppe (73–75). Eine Verbesserung der Gesamtmorbidität konnte jedoch nicht in allen Studien gezeigt werden.

Es wurden außerdem Studien mit den Wirkstoffen Prostaglandin E₁, dem Phosphodiesterasehemmer Amrinon, dem Beta-Oxidationshemmer Trimetazidin, Mannitol und Vitamin E durchgeführt (76–79). Vitamin E vermochte den IR-Schaden, beurteilt anhand der Plasmatransaminasen, zu vermindern. Auch die postoperative Liegezeit auf der Intensivstation ließ sich reduzieren (77). Trimetazidin konnte ebenfalls die Liegezeit verkürzen und IR-Schaden reduzieren (79). Bei Mannitol hingegen zeigte sich kein protektiver Effekt (78).

In Analogie zur kardialen Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika (31) untersuchten Beck-Schimmer und Mitarbeiter die Wirksamkeit von Sevofluran zur hepatischen Präkonditionierung und beobachteten eine Reduktion der Transaminasen sowie ein vermindertes postoperatives OP-Risiko im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (80). Braun *et al.* verglichen den Effekt einer Heliumpräkonditionierung im Rattenmodell mit IPC, wobei sich IPC, gemessen an den Serum-Transaminasekonzentrationen, als effektiver erwies (81).

1.4.3 Signalwege der hepatischen Präkonditionierung

Die molekularen Mechanismen der IPC an der Leber sind, trotz vieler Erkenntnisse und Ansätze, noch nicht vollständig erschlossen. Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung der grundlegenden Konzepte dargelegt. Die Signalwege münden vermutlich in gemeinsame Endstrecken und führen dazu, dass der Energiemetabolismus in der Zelle ökonomisiert und oxidativer Stress reduziert wird. Außerdem werden eine Homöostase des pH-Wertes und eine mildere inflammatorische Gewebsreaktion erzielt (82). Eine schematische Darstellung der Mechanismen findet sich in Abbildung 2.

Adenosin und seine Bindung an den Adenosin A₂ Rezeptor (A₂aR) scheint eine entscheidende Rolle bei der hepatischen IPC zu spielen. Durch das Binden von Adenosin an den Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst. Guaninnukleotid-bindende-Proteine (G-Proteine), Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase C (PLC) lösen eine Aktivierung von PKC sowie p38 mitogen-aktivierter Protein- (MAP-) Kinase aus (8,82–84).

Außerdem scheinen die A2aR mit der Proteinkinase A (PKA) und G-Proteinen gekoppelt zu sein. Durch Phosphorylierung des A2aR wird die Kopplung von stimulierenden G-Proteinen zu inhibierenden G-Proteinen verschoben, was eine Aktivierung des PLC-PKC Signalweges zur Folge hat (82).

Ein weiterer *trigger* der IPC Signalkaskade ist NO. NO stimuliert eine zwischengeschaltete Guanylatzyklase und durch die steigenden Konzentrationen von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) wird ebenfalls die p38 MAP-Kinase aktiviert (8,85).

Ein Anstieg von Adenosinmonophosphat (AMP) führt zur Aktivierung der AMP-abhängigen Proteinkinase (AMPK) (8,83). AMPK wiederum mildert den ATP-Mangel ab und führt dadurch zu einem verminderten Anfall anaerober Stoffwechselprodukte wie Laktat und wirkt einer Übersäuerung des Milieus entgegen (8,83).

Die Induktion von antioxidativen Verteidigungssystemen könnte eine Erklärung für die Abschwächung von oxidativem Stress bei IR durch IPC sein (8,13,86). Hierbei spielen u. a. Superoxiddismutase und Hitzeschockproteine (HSP) eine wichtige Rolle. Außerdem nimmt der Grad der Umwandlung von Xanthindehydrogenase (XDH) zu XOD ab, was die Entstehung von ROS zusätzlich einschränkt (8,87).

Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) ist bei der Regulierung von Genen, die bei der inflammatorischen Zellantwort beteiligt sind, involviert. Im Zusammenhang mit hepatischem IR-Schaden und IPC gibt es kontroverse Ergebnisse zur Rolle von NF- κ B. Teoh *et al.* beobachteten eine Aktivierung und verstärkte nukleäre Bindung von NF- κ B nach 30 Minuten Ischämie, bei vorangegangener IPC (84). Bei einer anderen Studie wurde durch IPC eine verminderte NF- κ B-Aktivität nach der Reperfusion festgestellt (82,88). Es existieren Hinweise, dass NF- κ B, welches durch IPC der Leber aktiviert wird (84), Gene moduliert, die beim IPC Geschehen eine Rolle spielen (82).

Möglicherweise sind NF- κ B und durch p38 MAPK regulierte Transkriptionsfaktoren wie *activated transcription factor 2* (ATF2) oder *myocyte specific enhancer factor 2C* (MEF2C) verantwortlich für die Expression von schützenden Genen (8,89,90).

HSP scheinen zur hepatischen IPC beizutragen. Es ließen sich erhöhte Expressionslevel von HSP 72 in IPC unterzogenen oder anders präkonditionierten Lebern bei der Ratte nachweisen (58,91). HSP stabilisieren Membranpotenziale in den hepatozellulären Mitochondrien und tragen so während der Reperfusion zu einer

schnelleren Restitution der Atmungskette bei (8). Für die Induktion der HSP spielt der *heat shock factor 1* (HSF1) eine entscheidende Rolle (8,90,92).

Hämoxxygenase-1 (HO-1), die ebenfalls zur Familie der HSP gehört (HSP 32), wird vermehrt in präkonditioniertem Gewebe exprimiert (8,80,92). Das Enzym aus dem Häm katabolismus, welches den Abbau von Häm zu Biliverdin, CO sowie Eisen katalysiert, ließ sich bei IPC, bei der Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff und bei rIPC im Rattenmodell vermehrt nachweisen (57,92,93). CO vermag dabei die inflammatorische und apoptotische Gewebsantwort abzumildern (14).

Transkriptionsfaktoren wie *signal transducer and activator of transcription* (STAT) sind Proteine, welche bei Zellproliferation und Verhinderung von Apoptose von Bedeutung sind (82,94). IPC aktivierte in der Leber den IL-6/STAT3 Signalweg, welcher bei Erhalt und Regeneration von Zellen bedeutsam ist (82,84,90).

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) ist wichtiger Bestandteil der Gewebsadaptation bei Sauerstoffmangel (82,95). Die β -Untereinheit dieses Heterodimers ist konstant exprimiert, während die α -Untereinheit (HIF-1 α) in oxigeniertem Gewebe fortwährend durch das Proteasomsystem degradiert wird (95). In hypoxischem Gewebe hingegen wird der Abbau von HIF-1 α verhindert, so dass eine Bindung an *hypoxic response elements* auf Genen, die beispielsweise Glykolyse, Glukosetransport oder Zellüberleben regulieren, möglich wird (82,95).

Alchera *et al.* konnten zeigen, dass HIF-1-Aktivierung eine starke Toleranz gegen ischämische Ereignisse induzierte (82,96). Die Aktivierung von HIF-1 α scheint bei der IPC von der Adenosinbindung an A2aR abhängig zu sein, was einen hypoxieunabhängigen Mechanismus der HIF-1 α Induktion darstellt (96).

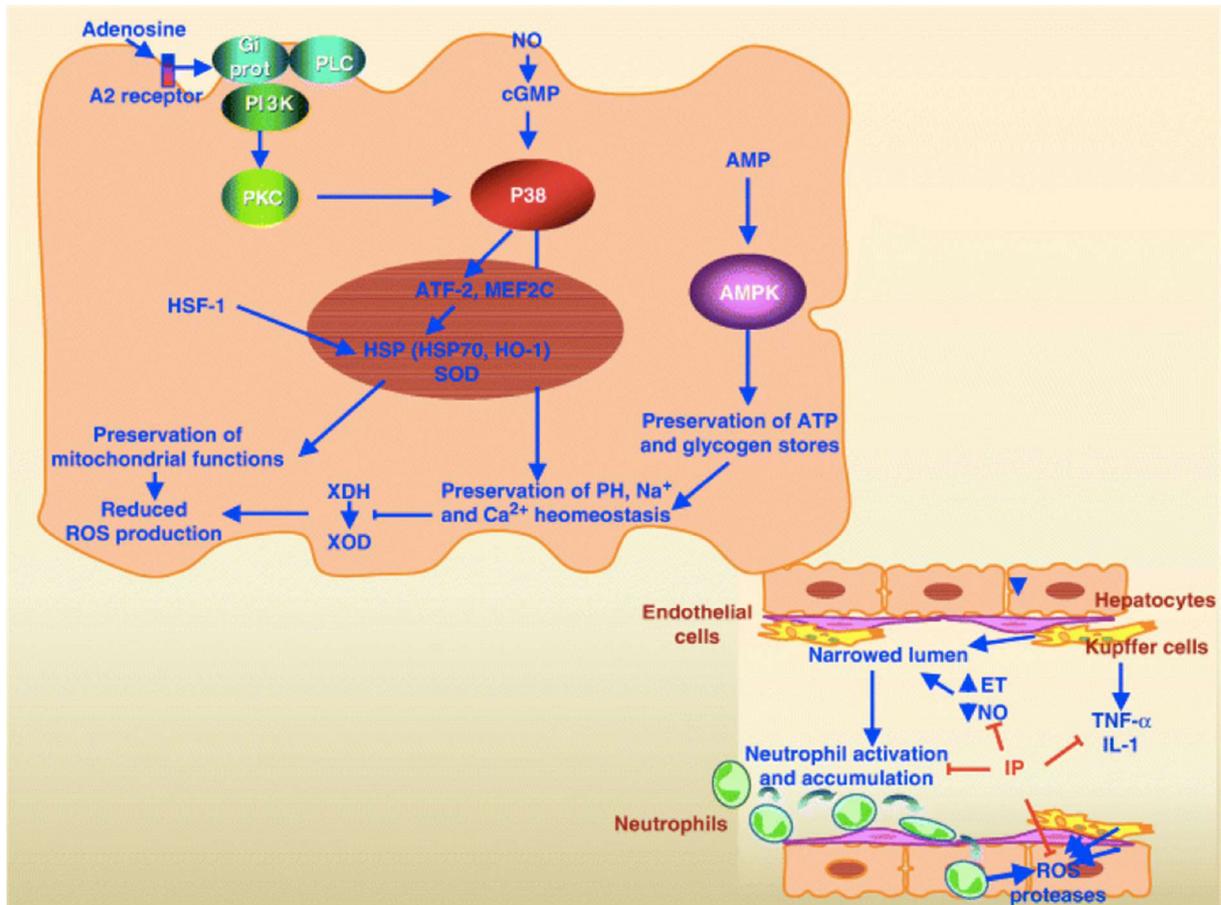


Abbildung 2: Mechanismen der hepatischen IPC (8). Links oben sind die intrahepatozytären Mechanismen dargestellt. Adenosin und NO bewirken über die Induktion von Transkriptionsfaktoren eine Stabilisierung der mitochondrialen Funktion, einen verminderten Anfall von ROS sowie Elektrolyt- und pH-Homöostase. AMPK vermittelt ausreichende ATP- und Glykogenspeicher. Rechts unten ist dargestellt, wie IPC IR-Schaden abmildert. Die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten wird abgeschwächt. Die Zytokinantwort auf IR wird gemindert. Es kommt durch eine bessere ET/NO-Balance zu weniger Vasokonstriktion. Es werden weniger ROS und Proteasen freigesetzt. Gi prot= Guaninnukleotid-bindendes-inhibitorisches Protein, PLC= Phospholipase C, PI3K= Phosphoinositol-3-Kinase, PKC= Proteinkinase C, NO= Stickstoffmonoxid, cGMP= zyklisches Guanosinmonophosphat, AMP= Adenosinmonophosphat, AMPK= AMP-abhängige Proteinkinase, MEF= *Myocyte specific enhancer Factor*, ATF= *activated Transcription Factor* XDH= Xanthindehydrogenase, XOD= Xanthinoxidase, ROS= reaktive Sauerstoffspezies, ET= Endothelin, IP= ischämische Präkonditionierung, SOD=Superoxiddismutase

IPC an der Leber vermag die inflammatorische Reaktion des Gewebes auf IR abzumildern (2,8,82,97). Oxidativer Stress wird vermindert (98), ebenso wie die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten (2). Weiterhin wird die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine reduziert sowie die Mikrozirkulation und sinusoidale Perfusion durch Regulierung von vasoaktiven Substanzen (ET, NO) verbessert (4,8,16,85). Dies führt zu einer verminderten Gewebsschädigung und zu einer verbesserten Regeneration des Organs.

1.5 Proteinanalytische Untersuchung der Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung

1.5.1 Proteomics

Der Begriff "*Proteomics*" wurde 1994 durch Mark R. Wilkins geprägt (99). Er benannte die Disziplin, in dem das Proteom untersucht wird, in Anlehnung an die Begriffe *Transcriptomics* und *Genomics*.

Proteine sind die Endprodukte, für welche das Genom den Bauplan darstellt. Die Proteinexpression ist jedoch keineswegs statisch. Etliche Faktoren beeinflussen sie und es finden posttranslationale Veränderungen, beispielsweise Phosphorylierungen oder Translokationen, statt. Viele intra- und interzelluläre Signalwege basieren auf diesen posttranslationalen Modifikationen oder Proteininteraktionen.

Das Vorhaben, Proteine zu katalogisieren, ist nicht neu. Jedoch haben technischer Fortschritt und neue Erkenntnisse zu neuen, weitergehenden Ansätzen geführt. Das Ziel ist, Proteine, die unter bestimmten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden, zu erfassen. Die Forschungsschwerpunkte liegen insbesondere darauf, diese Proteine zu identifizieren, zu quantifizieren und in ihrer Expressionsstärke zu vergleichen. Außerdem kommt der Untersuchung von posttranslationalen Veränderungen und Proteininteraktionen eine bedeutende Rolle zu.

Verbesserte Methoden zur Proteinauftrennung und -identifizierung wie die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE), differentielle-Gelelektrophorese (DIGE) und Massenspektrometrie- (MS) Verfahren haben auf diesem Gebiet eine Reihe neuer Erkenntnisse ermöglicht. Fortschritte in der Bioinformatik ließen einfach zugängliche, große Datenbanken im Internet entstehen.

1.5.2 Komparative Proteomanalyse

Bei einer vergleichenden Proteomanalyse, "*comparative proteomics*", wird nicht nach einem bestimmten Protein gesucht. Vielmehr ist der Ansatz quantitativ vergleichend. Möglichst alle Proteine, die z.B. in einer Zellfraktion enthalten sind, werden auf Veränderungen in ihrer Expression untersucht. So lässt sich feststellen, ob bei einer

bestimmten Behandlung, Proteine im Vergleich zu einer anders behandelten oder unbehandelten (Kontroll-) Probe hoch oder herunter reguliert werden. Proteine, die sich durch eine Behandlung (z.B. IPC) in ihrer Expression verändern, können so detektiert und anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden.

Grundlegende Voraussetzung für eine komparative Proteomanalyse ist eine gute Auftrennung der Proteine. Ein geeignetes Verfahren stellt die 2-DE dar. Sie wurde in den 1970er Jahren unabhängig voneinander durch O'Farrel und Klose erstmals angewandt (100,101). 2-DE kombiniert zwei Verfahren miteinander, die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die Gelelektrophorese.

Bei der IEF migrieren Proteine unter Anlegen einer Spannung entlang eines Polyacrylamid (PAA) Gelstreifens mit heutzutage meist immobilisiertem pH-Gradienten (IPG-*strip*). Unter Gleichgewichtsbedingungen sistieren sie an der Stelle, die ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht (102). Bei der 2-DE kombiniert man die Auftrennung nach pI mit der *sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide* gelelektrophorese (SDS-PAGE), bei der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) separiert werden (100,101). So erfolgt eine Auftrennung der Proteine im Gel nach pI und MW. Angefärbt mit Silbernitratlösung oder Coomassie Blau, stellen sich die Proteine als *spots* im Gel dar. Diese *spots* können mittels spezieller Software digitalisiert und bezüglich der Signalstärke verglichen werden.

Mit 2-DE ist es möglich, tausende Proteine in einem Gel aufzutrennen (100,103). Mit dieser Methode lassen sich ca. 10.000 Proteine auf einem 46 x 30 cm Gel darstellen. Gele dieser Größe sind schwierig zu handhaben und man benötigt viel Untersuchungsmaterial. Daher ist es hilfreich, die Proben vor der 2-DE subzellulär zu fraktionieren (103), um zum Einen die Komplexität des Proteingemischs zu verringern und zum Anderen um Proteine mit niedriger Abundanz auftrennen und detektieren zu können. Dafür gibt es diverse Methoden (104). Unsere Arbeitsgruppe verwendete differentielle Zentrifugationsschritte, um das Gewebelysat der Proben vor der 2-DE in subzelluläre Fraktionen aufzuteilen.

Häufig werden IPG-*strips* mit einem pH-Gradienten von 3-10 bei der Auftrennung nach dem pI verwendet. Für eine schärfere Auftrennung in engeren pH-Bereichen sind *Zoom* IPG-*strips* mit einem Gradienten von pH 4-7 oder pH 6-10 erhältlich

(103).. Die Auswahl dieser pH-Gradienten begründet sich durch die Verteilung der zu erwartenden pI der Proteine in einem Gewebe. So konzentrieren sich die pI der meisten Proteine entweder um pH 5 oder pH 9 (105) (siehe Abbildung 3).

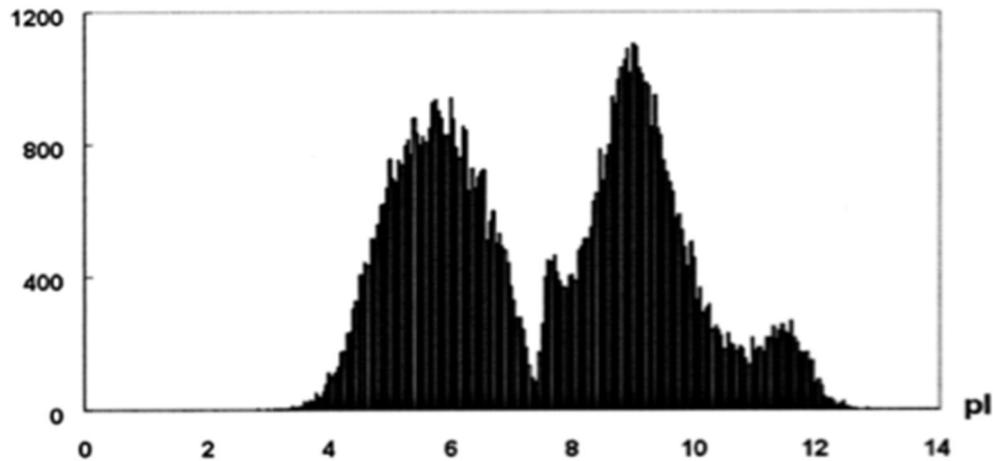


Abbildung 3: Proteinverteilung nach pI *Homo Sapiens* (27.941 Proteine). Grafik nach Wu *et al.* 2006 (105). Die x-Achse zeigt den pI-Wert, die y-Achse zeigt die Anzahl der Proteine an.

Die wenigen bisher beschriebenen proteomanalytischen Ansätze zur hepatischen IPC beschränkten sich meist auf die Verwendung von IPG-*strips* mit einem pH-Gradienten im Bereich pH 3-10. Es ist jedoch bei über 6.000 bekannten Leberproteinen (106) davon auszugehen, dass geringer abundante Proteine erst bei engeren pH-Bereichen detektiert und klar abgegrenzt werden können.

In dieser Arbeit wurde der pH-Bereich 4-7 der zytosolischen Proteinfraction untersucht, um gut diskriminieren zu können und eine möglichst exakte Auftrennung bei einem komplexen Proteom, wie es in der Leber vorliegt, gewährleisten zu können. Im Rahmen der Gesamtstudie (Molekulare Mechanismen des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens und ischämischer Präkonditionierung: Regulation der Expression von Proteinen, Proteinmodifikationen und microRNAs) wurden durch die Arbeitsgruppe zusätzlich der basische pH-Bereich des Zytosols, die mitochondriale Proteinfraction sowie posttranslationale Modifikationen im Zytosol untersucht (Dissertationsprojekte von F. Stelzner und Dipl. Biol. T. Strahl). So konnte die 2-DE proteinfractionsspezifisch für saure bzw. basische Proteine optimiert und durchgeführt werden.

1.5.3 Das Leberproteom

Die Leber ist eines der komplexesten Organe des Organismus. Ihre Aufgaben gehen weit über die Digestion von enteral absorbierten Nährstoffen hinaus. So dient sie beispielsweise während der Fetalzeit der Erythropoese, ist in die Detoxifikation xenobiotischer Noxen involviert, produziert wichtige Plasmaproteine und vieles mehr.

Bisher wurden über 6.000 Leberproteine identifiziert. Damit ist das humane Leberproteom (HLP) die größte Proteindatensammlung zu einem menschlichen Organ (106–108). Die Daten zum humanen Lebertranskriptom umfassen 11.205 exprimierte Gene. Außerdem stellt das HLP das erste Proteom mit dazugehörigem Transkriptom, welches aus denselben Proben gewonnen wurde, dar (106). Informationen zum Leberproteom sind über <http://liverbase.hupo.org.cn> abrufbar. Dort werden Proteine mit Funktion, Abundanz, subzellulärer Lokalisation und ggf. assoziierten Pathologien aufgelistet (107).

Es gibt Hinweise, dass es Schlüsselproteine und Proteininteraktionen gibt, die bei der IPC wichtige Rollen spielen. Bei der hepatischen IPC wurde hierzu bisher wenig Grundlagenforschung betrieben. Ein besseres Verständnis der Mechanismen könnte zu neuen therapeutischen Ansätzen gegen IR-Schaden führen.

1.5.4 Proteomanalytische Studien im Rahmen hepatischer ischämischer Präkonditionierung und Ischämie-Reperfusionsschaden

Obwohl Hinweise existieren, dass den an IPC und IR beteiligten Signalwegen Veränderungen im Proteom zugrunde liegen (109), wurden bisher nur wenige komparative Proteomstudien zur hepatischen Präkonditionierung und IR durchgeführt.

Vascotto und Avellini *et al.* untersuchten mittels 2-DE und Matrix-assistierter Laser Desorption/Ionisation *time of flight* MS menschliche Leberbiopsien im Rahmen von LTx. Dies war der erste globale proteomanalytische Ansatz zur Erforschung von hepatischen IR-Schäden bei LTx. Die Autoren entnahmen jeweils eine Leberbiopsie zu Beginn der kalten Ischämiezeit nach Entnahme beim Spender und nach Reanastomose der Gefäße, nachdem das Organ dem Empfänger implantiert wurde. Die Lysate der entsprechenden Biopsien wurden im Hinblick auf Proteinexpression

verglichen. Ziel war es, Schlüsselproteine zu identifizieren, die bei der Reperfusion nach der Ischämiezeit eine Rolle spielen. Es zeigten sich 36 signifikant regulierte Proteine, die mehrheitlich in den Energiemetabolismus und die oxidative Stressantwort involviert sind (5).

Um weitere frühe Zielproteine von oxidativem Stress zu identifizieren, inkubierten Avellini *et al.* HepG2-Zellen (humane Hepatomazelllinie) mit H₂O₂. Mit einem 2-DE/MS Ansatz identifizierten sie vier differentiell exprimierte Proteine, die sensitiv für oxidativen Stress waren und posttranslationale Veränderungen aufwiesen (110).

Hirsch *et al.* zeigten im Rattenmodell nach IR sowohl inflammatorische als auch antioxidative Proteine im Kupferzellproteom signifikant hochreguliert (111). Die Ergebnisse lassen eine wichtige Rolle der Kupfer-Zellen bei IR vermuten. In dieser Studie wurde eine IR-Gruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Emadali *et al.* identifizierten *Ras GTPase-activating-like protein* als Regulator von Zytoskeletalterationen in einem proteomanalytischen Ansatz im Rahmen von IR bei LTx (112).

All diese Studien befassten sich jedoch ausschließlich mit den Auswirkungen von IR und nicht von IPC.

Xu *et al.* untersuchten im Mausmodell differentiell exprimierte Proteine bei IPC und IR im Vergleich zur Kontrollgruppe (109). Die Autoren beschreiben 20 mindestens um das 1,5-fache regulierte Proteine. Unter anderem zeigte sich, dass die β -Untereinheit der ATP-Synthase (ATP5 β), ein wichtiges Enzym bei der ATP-Generierung, bei den IR-Tieren herabreguliert war. IPC vermochte diese verminderte Expression von ATP5 β abzumildern.

Oshima und Mitarbeiter untersuchten mit einem DIGE-Ansatz Modifikationen des mitochondrialen Proteoms nach IR (113). Die Ergebnisse dieser Proteom Studie am Rattenmodell sind kontrovers zu vielen anderen Studien (62–68). Es zeigte sich kein hepatoprotektiver Effekt durch IPC, gemessen an den Transaminasen im Plasma. Jedoch beschreiben auch hier die Autoren 13 hoch- bzw. herabregulierte, mitochondriale Proteine (113). Dies weist darauf hin, dass den Mitochondrien eine wichtige Funktion bei IPC und IR zukommt.

Es ist unstrittig, dass es noch viele unerschlossene Effektoren der hepatischen IPC auf Proteinebene gibt. Fortschritte auf dem Feld der *Proteomics* öffnen neue Türen,

um Mechanismen der IPC zu erschließen, die sich beispielsweise pharmakologisch nutzen lassen könnten. Dies könnte in Zukunft dazu beitragen, dass eine Organdysfunktion bzw. ein gravierender IR-Schaden nach LTx oder anderen Lebereingriffen verringert werden.

1.6 Ziele der Arbeit

IR-Schäden stellen bei Lebereingriffen wie LR oder LTx ein klinisch relevantes Problem dar und führen in vielen Fällen zu Komplikationen bis hin zur Organdysfunktion. Bei LTx hat der Mangel an Spenderorganen zur Folge, dass vermehrt "*marginal grafts*", also steatotische Lebern oder Organe von älteren Spendern transplantiert werden. Diese *marginal grafts* sind anfälliger für einen IR-Schaden als integrale Organe (2–4). Es ist bekannt, dass IPC sowohl Lebertransplantate als auch im Rahmen von anderen Lebereingriffen einer IR ausgesetzte Organe vor diesen Schäden schützen kann (5,23,25,65,66).

Trotz intensiver Forschung bleiben viele der zugrundeliegenden Mechanismen dieses Phänomens bis heute unklar. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit einem globalen, komparativen, proteomanalytischen 2-DE/MS Ansatz differentiell exprimierte Proteine im Rahmen von IPC und IR zu identifizieren.

Ziele dieser Arbeit waren im Einzelnen:

- die probenspezifische Optimierung der 2-DE, um eine gute technische Reproduzierbarkeit der 2D-Gele zu gewährleisten und eine aussagekräftige Auswertung zu ermöglichen
- die Identifizierung differentiell exprimierter hepatischer Proteine im sauren pH-Bereich des Zytosols im Rahmen von IPC und IR. Analysiert werden sollten:
 - der Effekt der OP-Liegezeit (scheinoperierte Kontrollen zu den Zeitpunkten 20 Minuten und 140 Minuten nach Versuchsbeginn)
 - der Effekt der alleinigen IPC (IPC-Gewebe verglichen mit Kontrollen unmittelbar nach Beendigung des IPC-Protokolls und nach 140 Minuten)
 - der Effekt der IPC im zeitlichen Verlauf (Gewebe unmittelbar nach Beendigung des IPC-Protokolls verglichen mit IPC Gewebe nach je 60 Minuten Ischämie und Reperfusion)

- der Effekt von IR an nicht präkonditioniertem Gewebe und an IPC-Gewebe
- die Einordnung der identifizierten Proteine in den wissenschaftlichen Kontext

Für die Studie wurde Lebergewebe aus einer experimentellen Untersuchung bei der Ratte nach 70%iger warmer IR verwendet.

Die Ziele sollten durch die Erstellung von Expressionsprofilen der Proteine des pH-Bereichs 4-7 der zytosolischen Fraktion erreicht werden. Untersucht wurde Gewebe nach warmer IR mit- und ohne vorgeschaltete IPC sowie IPC alleine und Scheinoperation. Die massenspektrometrische Identifizierung differentiell exprimierter Proteine beim Vergleich der unterschiedlich behandelten Proben soll dazu beitragen, Signalwege von IPC und IR zu ergründen. Langfristig könnten die Erkenntnisse zu neuen therapeutischen Strategien gegen IR-Schaden an Lebergewebe führen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Die für die Untersuchung verwendeten Chemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad. Sie wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (St. Louis, Montana, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer MilliQ Anlage (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland).

Weitere für die Versuchsreihe eingesetzte Geräte werden an der entsprechenden Stelle im Material und Methoden Teil dieser Arbeit genannt.

2.2 Tiermodell

Das *in vivo*-Modell der partiellen, warmen Leberischämie mit Reperfusion bei der Ratte wurde nicht von mir selbst durchgeführt sondern von wissenschaftlichen Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Braun).

Die hierbei gewonnenen Lebergewebeprobe wurden bei -80 °C gelagert. Meine Aufgabe bestand in der Aufbereitung des gefrorenen Lebergewebes und der sich anschließenden Proteinanalytik. Da die *in vivo*-Untersuchungen die Grundlage für mein Dissertationsprojekt liefern, ist das hierzu verwendete experimentelle Modell zum besseren Verständnis der Studie in der vorliegenden Dissertationsschrift beschrieben.

2.2.1 Genehmigung

Die untersuchten Gewebe stammten aus den Tierversuchsvorhaben mit den Aktenzeichen: 8.87-5010.34.09.017 und 87-51.04.2010.A011. Zum besseren Verständnis der Studie wird das experimentelle Protokoll kurz beschrieben.

2.2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar Ratten aus der Zucht der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben des

Universitätsklinikums Düsseldorf. Sie wurden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten und hatten einen festen 12 Stunden Tag- Nachtrhythmus. Sie fasteten über Nacht, ansonsten standen ihnen Futter und entkeimtes Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.3 Versuchsprotokoll und Organentnahme

Das folgende tierexperimentelle Protokoll für die hepatische Präkonditionierungsbehandlung und die Induktion einer partiellen warmen Leberischämie mit Reperfusion wurde im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie (Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD)) etabliert und durchgeführt. Für die Untersuchung wurden 36 Tiere in sechs Gruppen randomisiert (vgl. Abbildung 4). Die Pfeile in Abbildung 4 indizieren die Zeitpunkte der Probenentnahme. Pro Entnahmezeitpunkt wurden sechs Versuchstiere operiert (n=6 biologische Replikate).

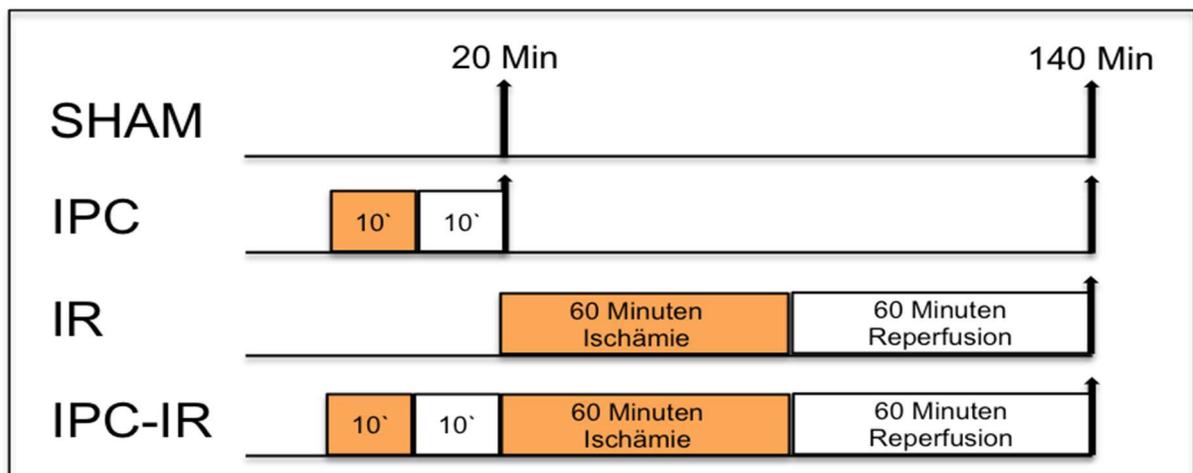


Abbildung 4: Versuchsprotokoll. Die Tiere der Gruppen IPC sowie IPC-IR wurden für 10 Minuten ischämisch präkonditioniert und für 10 Minuten reperfundiert. Bei den Tieren der Gruppen IR sowie IPC-IR wurde nach 20 Minuten eine 60-minütige Leberischämie induziert, gefolgt von 60 Minuten Reperfusion. Die Tiere der SHAM-Gruppe dienten als scheinoperierte Kontrollgruppe. Die Pfeile indizieren die Zeitpunkte der Probenentnahme. Pro Entnahmezeitpunkt wurden sechs Tiere operiert. IPC= Ischämische Präkonditionierung, IR= Ischämie-Reperfusion

Gruppeneinteilung (je n=6) nach Präkonditionierungsbehandlung und Zeitpunkt der Probenentnahme:

SHAM20 scheinoperierte Kontrollgruppe, Probenentnahme 20 Minuten nach Narkose und Laparotomie

SHAM140	scheinoperierte Kontrollgruppe, Probenentnahme 140 Minuten nach Narkose und Laparotomie
IPC20	ischämisch präkonditionierte Gruppe mit 10-minütiger Ischämie und 10-minütiger Reperfusion, Probenentnahme 20 Minuten nach Versuchsbeginn
IPC140	ischämisch präkonditionierte Gruppe mit 10-minütiger Ischämie und 10-minütiger Reperfusion, Probenentnahme 140 Minuten nach Versuchsbeginn
IR	Gruppe mit 60-minütiger Ischämie und 60-minütiger Reperfusion, Probenentnahme 140 Minuten nach Versuchsbeginn
IPC-IR	ischämisch präkonditionierte Gruppe mit 10-minütiger Ischämie sowie 10-minütiger Reperfusion gefolgt von 60 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion

Die Einleitung der Anästhesie fand durch eine intraperitoneale Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos, Deutschland) Injektion statt, die Aufrechterhaltung durch fortlaufende intravenöse Gabe von Pentobarbital.

Die Körpertemperatur wurde mittels einer Wärmeplatte konstant bei 36-37 °C gehalten. Blutdruck und Herzfrequenz wurden intraarteriell gemessen. Elektrolyte, Säure- und Basenhaushalt sowie Blutgaskonzentrationen wurden mittels Blutgasanalyse kontrolliert und bei Abweichung von den Normwerten korrigiert.

Die Tiere wurden nach Einleitung der Anästhesie einer medianen Laparotomie zugeführt. Es wurden die für die Ischämieinduktion wichtigen Strukturen freipräpariert insbesondere das *ligamentum hepatoduodenale*. Der *ductus choledochus* wurde kanüliert, damit während des gesamten folgenden Procedere der Gallenfluss gemessen werden konnte.

Zur Induktion der Ischämie wurde ein Gefäßclip auf das *ligamentum hepatoduodenale* platziert, so dass die portale Trias, bestehend aus *arteria hepatica*, *vena portae* sowie *ductus choledochus* okkludiert wurde und zu einer 70%igen Leberischämie führte. Das Ischämieareal erstreckte sich über den linken und medianen Leberlappen. Der intestinale venöse Abfluss war weiter gewährleistet.

Der *clip* wurde zur Präkonditionierung der IPC-Gruppe und der IPC-IR-Gruppe für 10 Minuten aufgesetzt, gelöst und es folgte eine ebenfalls 10-minütige Reperfusionsphase. Bei der IPC-IR-Gruppe schloss sich eine weitere Ischämiezeit von 60 Minuten gefolgt von einer Reperfusionszeit von ebenfalls 60 Minuten an. Bei

Versuchstieren der IR-Gruppe wurde lediglich die 60-minütige Ischämie gefolgt von der Reperfusion ohne Präkonditionierung durchgeführt.

Am Ende der Operation wurden die Tiere mittels eines Pentobarbital Bolus euthanasiert und exsanguiert. Anschließend wurde die Leber mit 4 °C kalter Natriumchloridlösung (NaCl) gespült und das Organ wurde getrennt nach ischämischen und nicht ischämischen Anteilen entnommen. Die Proben der ischämischen Anteile wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.3 Verarbeitung der Organproben

2.3.1 Homogenisierung

Etwa 200-400 mg Lebergewebe wurden in einem zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlten Metall-Potter mit einem Hammer pulverisiert (3-4 Schläge).

Das gewonnene Organpulver wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gefüllt und mit ca. 3 ml Lysispuffer I (siehe Tabelle 1) übergossen. Um die Umgebungstemperatur konstant bei 4 °C zu halten, standen die Röhrchen in einem eisgefüllten Behälter.

Das Gemisch aus Gewebepulver und Lysispuffer wurde jeweils drei Mal für drei Sekunden mit einem großen und einem kleinen Aufsatz homogenisiert (IKA, Staufen, Deutschland).

Wurden mehrere verschiedene Proben homogenisiert, wurden die Aufsätze zwischen den einzelnen Homogenisiervorgängen mit Ethanol gereinigt.

Das Homogenisat jeder Leberprobe wurde in drei 1,5 ml LoBind Probengefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gefüllt. Somit wurden drei technische Replikate je Gewebeprobe erstellt.

Tabelle 1: Stammlösung, Proteaseninhibitoren, Lysispuffer I

Chemikalie/Lösung	Menge/Volumen
Stammlösung	
Sigma 7-9 (Trizma Base)	60,57 mg
NaF	210 mg
Na ₃ VO ₄	36,78 mg
EGTA	76,08 mg
MilliQ destilliertes H ₂ O	100 ml
Proteasen-Inhibitoren-Mix	
Pepstatin	2 µg/ml
Leupeptin	2 µg/ml
Aprotinin	2 µg/ml
Lysispuffer I	
Stammlösung	10 ml
Inhibitoren-Mix	200 µl
Dithiothreitol (DTT)	7,7 mg

Tabelle 2: Lysispuffer II

Chemikalie/Lösung	Menge/Volumen
Lysispuffer I	1 ml
Sucrose	102 mg
NaCl	28 mg

2.3.2 Gewebefraktionierung

Durch verschiedene Zentrifugationsschritte wurde das Gesamtlysat in die zytosolische, die mitochondriale, die nukleäre sowie die membranöse Fraktion aufgetrennt (vgl. Abbildung 5). Die Fraktionierung diente der Komplexitätsverringering und der proteinfraktionsspezifischen Analyse (104). In dieser Arbeit wurde die zytosolische Proteinfraktion verwendet. Das mitochondriale Proteom wurde im Rahmen der Gesamtstudie durch Dipl. Biol. T. Strahl analysiert, posttranslationale Modifikationen durch F. Stelzner.

Zunächst wurde das Gesamtlysat der Probe, welches bei der Homogenisierung gewonnen wurde, bei 4 °C mit 600 g für 15 Minuten zentrifugiert (Mikro 220R

Zentrifuge, Hettich, Bäch, Schweiz). Anschließende Zentrifugationsschritte bis 16.000 g wurden ebenfalls in dieser Zentrifuge ausgeführt.

Nach diesem ersten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein weiteres Probengefäß (Eppendorf) überführt. Dieses wurde für 20 Minuten bei 4 °C mit 15.000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl Lysispuffer II (siehe Tabelle 2) resuspendiert und für 15-30 Minuten inkubiert.

Der Überstand wurde abermals abpipettiert und in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) gefüllt. In diesem wurde für eine Stunde bei 144.000 g und 4 °C ultrazentrifugiert (Optima Ultrazentrifuge TLA-100.3 fixed Angle Rotor, Beckmann Coulter). Der Überstand enthielt die zytosolische subzelluläre Fraktion.

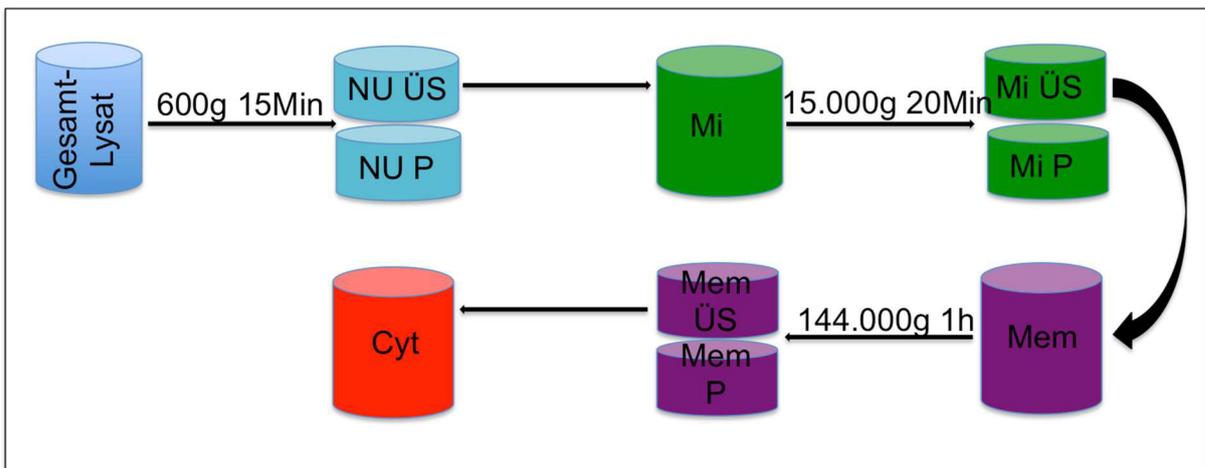


Abbildung 5: Schema der differentiellen subzellulären Fraktionierung. Die farbigen Zylinder stellen Proteinfraktionen dar, die bei den jeweiligen Zentrifugationsschritten gewonnen wurden. Das Prozedere wurde je Gewebeprobe drei Mal durchgeführt entsprechend drei technischer Replikate. In dieser Arbeit wurde die Zytosolfraktion untersucht. NU= nukleäre Fraktion; Mi= mitochondriale Fraktion; Mem= Membranfraktion, Cyt= Zytosolfraktion; ÜS= Überstand; P= Pellet

2.3.3 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Proteine erfolgte mittels Proteinbestimmung nach Lowry (114).

Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen der Proteinbestimmung nach Lowry

Reagenz	Zusammensetzung
Reagenz A	10 g Na ₂ CO ₃ in 500 ml 0,1 M NaOH
Reagenz B	2 g K Na-Tartrat ad 100ml MilliQ destilliertes H ₂ O
Reagenz C	1 g Cu-Sulfat ad 100 ml MilliQ destilliertes H ₂ O
Lösung I	20 ml Reagenz A mit 200 µl Reagenz B und 200 µl Reagenz C
Lösung II	Folins Reagenz mit MilliQ destilliertem H ₂ O 1:1

Die zu messenden Proben wurden 1:100 verdünnt (5 µl Probe auf 495 µl destilliertes Wasser).

500 µl Lösung I (siehe Tabelle 3) wurden mit 100 µl verdünnter Probe oder Standardlösung (bovines Serumalbumin mit bekannter Proteinkonzentration) gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl Lösung II (siehe Tabelle 3) zu den Proben und Standards hinzugegeben und abermals für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden von jeder zu messenden Probe und der Eichreihe jeweils 200 µl im Doppelansatz in eine 96 Well Platte pipettiert und die Proteinkonzentration am *Synergy 2 Plate Reader* (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen. Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben entweder bei -80 °C eingefroren oder sofort einer Proteinfällung (vgl. Kapitel 2.5.1) zugeführt.

2.4 Evaluierung der Proteinfractionierung durch Western Blot Analyse

Um die Reinheit und somit den Erfolg der Proteinfractionierung nachzuweisen, wurden Western Blots mit Antikörpern gegen zellfraktionsspezifische Proteine von Dipl. Biol. T. Strahl durchgeführt.

Beim Western Blot werden Proteine auf eine Membran übertragen und mittels konsekutiver Antikörperreaktionen visualisiert. Die Proteine in der Probe werden in einer SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt und dann auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) geblottet.

Die Western Blots wurden einmalig, exemplarisch an den Proteinfractionen nach Aufbereitung der Probe durchgeführt. Es wurde jeweils ein Western Blot für die subzellulären Fraktionen Zytosol, Mitochondrien, Zellkern und Zellmembran mit

einem Antikörper gegen ein fraktionsspezifisches Protein durchgeführt (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Fraktionsspezifische Antikörper zur Durchführung der Western Blot-Analyse

Antigen Protein	Antikörper/ Verdünnung	Zellfraktion	Hersteller
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	anti-GAPDH (<i>mouse</i>)/ 1:60.000 in 1%iger <i>Blocking Solution</i>	zytosolisch	Abcam #ab-8245
Prohibitin	anti-Prohibitin (<i>rabbit</i>)/ 1:10.000 in 1%iger <i>Blocking Solution</i>	mitochondrial	Abcam #ab-2996
Lamin B	anti-Lamin B (<i>goat</i>)/ 1:10.000 in 1%iger <i>Blocking Solution</i>	nukleär	Santa Cruz #sc-6217
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	anti-Na ⁺ /K ⁺ ATPase (<i>mouse</i>)/ 1:5.000 in 1%iger <i>Blocking Solution</i>	membranös	Abcam #ab-7671

Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in Gelkammern von Bio-Rad (München, Deutschland).

Es wurde ein 11%iges PAA Trenngel verwendet. Über dem Trenngel (siehe Tabelle 5) liegt bei der SDS-PAGE ein Sammelgel (5% PAA) (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5: Zusammensetzung von zwei 11% PAA Trenngelen

Chemikalie	Volumen
Polyacrylamid 30%	7,38 ml
MilliQ H ₂ O	7,42 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5,00 ml
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10%	200 µl
Temed	20 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	100 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung von zwei 5%igen Sammelgelen

Chemikalie	Volumen
Polyacrylamid 30%	2,55 ml
MilliQ Wasser	10,5 ml
SDS 10%	150 µl
1,25 M Tris-HCl pH 6,8	1,5 ml
Temed	30 µl
Amoniumpersulfat (APS) 10%	150 µl

Die Katalysatoren der Polymerisationsreaktion Temed und APS wurden bei Trenn- und Sammelgel zuletzt hinzugegeben. Mit einem Kamm wurden Taschen im Sammelgel zur Befüllung mit Proben freigehalten.

Das PAA-Gel wurde in die Kammer (Biotechnologie 45-1010-i Gel Anlage, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) eingespannt und diese mit Laufpuffer (siehe Tabelle 7) aufgefüllt. Der Kamm wurde entfernt. Es wurde ein Ladepuffer (siehe Tabelle 8) - Probengemisch (1:5), das auf 95 °C erhitzt war, sukzessive pro Tasche mit je 10 µg Protein der zytosolischen, der mitochondrialen, der nukleären sowie der membranösen Proteinfraction beladen. Außerdem wurde eine Tasche mit 10 µg Protein aus dem Gesamtlisat und eine mit 2 µl Protein Marker (Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad) befüllt.

Die Proben migrierten bei 50 V für 30 Minuten in das Trenngel. Danach wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Als die Bromphenol-Blau-Lauffront den unteren Bereich des Gels erreicht hatte, wurde das Gel entnommen.

Tabelle 7: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers

Chemikalie	Menge/Volumen
Tris-HCl	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
MilliQ H ₂ O	10 l

Tabelle 8: Zusammensetzung des Ladepuffers

Chemikalie	Menge/Volumen
MilliQ Wasser	3,9 ml
Glycerol	0,8 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1 ml
SDS 10%	1,6 ml
Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenol Blau	Spatelspitze

Für den Western Blot wurde eine PVDF-Membran zurechtgeschnitten. Außerdem wurden 16 Filterpapierstreifen präpariert. Die PVDF-Membran wurde 30 Sekunden in Methanol und anschließend in schwachem Anodenpuffer (vgl. Tabelle 9) getränkt. Die Blotkammer (Multiphor II, General Electric (GE) Healthcare, Uppsala, Schweden) wurde zusammengesetzt, sodass PVDF-Membran und das Gel, eingebettet in zu jeder Seite acht Filterstreifen, zwischen Kathode und Anode lagen. Es wurde eine Spannung angelegt und mit einer Stromstärke von 204 mA ($0,8 \text{ mA/cm}^2$) für zwei Stunden geblottet, damit die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und somit auf die PVDF-Membran wandern (siehe Abbildung 6).

Tabelle 9: Western Blot Puffer

Puffer	Reagenzien
schwacher Anodenpuffer	0,025 M Tris-HCl Methanol 20%
starker Anodenpuffer	0,3 M Tris-HCl Methanol 20%
Kathodenpuffer	0,04 M Aminocaprinsäure Methanol 20%

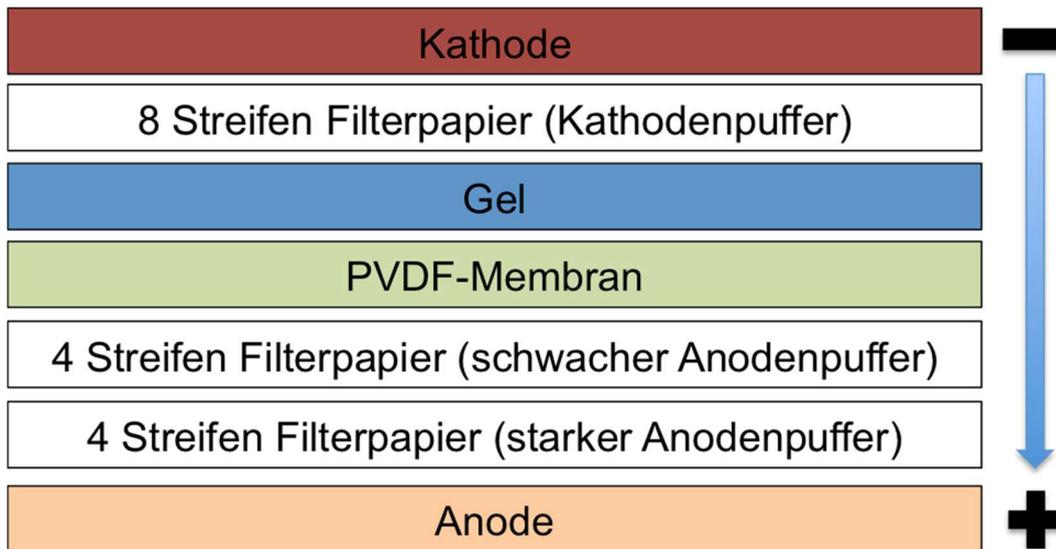


Abbildung 6: Schematische Darstellung Western Blot. Das Gel und die PVDF Membran befinden sich zwischen acht Streifen in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränktem Filterpapier. Unter Anlage einer Spannung wandern die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode und in die PVDF Membran.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran entnommen, mittels Ponceaufärbung verifiziert, ob der Transfer erfolgreich war und für zwei Stunden auf einem Kippschüttler in 5%iger *Blocking Solution* (vgl. Tabelle 10) eingelegt, mit dem Ziel, unspezifische Bindungsstellen für die zellfraktionsspezifischen Antikörper zu blockieren.

Tabelle 10: Tris-buffered Saline (TBS) Tween-Lösung, Blocking solution 1% und 5%

TBS-Tween	Blocking Solution 1%	Blocking Solution 5%
Tween 2 ml	Dried skimmed milk 10 g	Dried skimmed milk 50 g
TBS 10 Tabletten	TBS 5 Tabletten	TBS 5 Tabletten
MilliQ-Wasser 2000 ml	Tween 1 ml	Tween 1 ml
	MilliQ-Wasser 1000 ml	MilliQ-Wasser 1000 ml

Die fraktionsspezifischen Antikörper wurden in 1%iger *Blocking Solution* (vgl. Tabelle 10) laut Herstellerangaben verdünnt. Die PVDF-Membran wurde über Nacht in 5 ml der Antikörperlösung bei 4 °C auf einem Kippschüttler stehen gelassen.

Bevor die Membran in einem zweiten Inkubationsschritt in einer Lösung mit Peroxidase-gebundenen Antikörpern (siehe Tabelle 11) eingelegt und für zwei Stunden belassen wurde, wurde sie dreimal für jeweils zehn Minuten in einer *Tris-*

buffered-Saline (TBS)-*Tween* Lösung (siehe Tabelle 10) gewaschen. Nach Inkubation mit Sekundärantikörpern wurden die Waschschrte wiederholt.

Tabelle 11: Peroxidase-gebundene Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti- <i>mouse</i>	1:10.000 in 1%iger <i>Blocking Solution</i>	Jackson/Dianova #115-035-1003
anti- <i>rabbit</i>	1:10.000 in 1%iger <i>Blocking Solution</i>	Jackson/Dianova #711-035-152
anti- <i>goat</i>	1:10.000 in 1%iger <i>Blocking Solution</i>	Jackson/Dianova #705-035-003

Die Peroxidasereaktion wurde mit 2 ml *Enhanced Chemoluminescence Reagent* gestartet. Die Chemolumineszenz der Peroxidasereaktion wurde mittels einer Kamera (CoolSNAP HQ, Photometrics, Tucson, Arizona, USA) detektiert und mit der Gel Pro Analyzer Software (MediaCybernetics Inc., Bethesda, Maryland, USA) visualisiert.

2.5 Auftrennung des zytosolischen Proteoms im sauren pH-Bereich

2.5.1 Proteinfällung

Um Proteine von anderen Zellbestandteilen wie Salzen, Lipiden oder DNA zu trennen, wurde eine Trichloressigsäure (TCA)-/Aceton Fällung durchgeführt. 250 µg Protein wurden mit Lysispuffer I (vgl. Tabelle 1) auf 100 µl aufgefüllt.

Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die 100 µl Aliquots wurden entweder bei -80 °C für die spätere Verarbeitung eingefroren oder die Proteinfällung sofort durchgeführt.

Jedem Aliquot wurden 800 µl -20 °C kaltes Aceton sowie 100 µl TCA hinzugegeben und das Gemisch über Nacht bei -20 °C eingefroren.

Anschließend wurde drei Mal bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert (Mikro 220R Zentrifuge, Hettich). Der Überstand wurde nach jeder Zentrifugation abgenommen und es wurde mit frischem eiskalten Aceton wieder auf 1 ml aufgefüllt. Nach dem

letzten Schritt wurde das Aceton abgenommen und das Proteinpellet für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen gelassen.

2.5.2 Rehydrierung

Vor der IEF wurden die gefällten Proteinpellets wieder gelöst und die *IPG-strips* (Immobiline™ DryStrip pH 4-7 NL, GE Healthcare) rehydriert. Der Rehydrierungspuffer (vgl. Tabelle 12) wurde mit 1% *carrier* Ampholyten (GE Healthcare) und 6 mg DTT pro ml versetzt. Die Ampholyte dienen dazu, die Leitfähigkeit entlang des Fokussierstreifens sowie die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen.

Tabelle 12: Rehydrierungspuffer

Chemikalie	Menge
Urea	42,42 g
Thiourea	15,2 g
CHAPS Detergenz 2%	2 g
Bromphenol Blau	Spatelspitze
MilliQ Wasser	ad 100 ml

CHAPS=Cholamidopropyldimethylammoniopropansulfonat

Die Pellets wurden mit 125 µl Rehydrierungspuffer versetzt und das Gemisch wurde zur besseren Löslichkeit für drei Minuten in ein Ultraschallbad (Sonorex Super RK100SH, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) gelegt. Danach wurde es für mindestens eine Stunde zum Lösen der Proteine auf den Schüttler (VV3, VWR, Darmstadt, Deutschland) gestellt. Zur *in-gel-rehydration* wurde die Lösung auf ein *Rehydration-Tray* (Serva, Heidelberg, Deutschland) pipettiert.

Zur Proteinbeladung wurde ein *IPG-strip* (pH-Wert 4-7) vorsichtig auf diese Lösung mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Luftblasen wurden entfernt. Die *IPG-strips* wurden mit jeweils 1,5 ml Silikonöl (PlusOne Dry Strip Cover Fluid, GE Healthcare) übergossen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Proteinbeladung erfolgte über etwa 12 Stunden bei Raumtemperatur.

2.5.3 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Bei der 2-DE werden die Proteine einer Probe in der ersten Dimension nach ihrem pI und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

2.5.3.1 1. Dimension, isoelektrische Fokussierung

Zur IEF wird an dem proteinbeladenen IPG-*strip* eine Spannung angelegt. Die mit Ampholyten versetzten Proteine migrieren entlang des pH-Gradienten in Richtung Anode und sistieren an der ihrem pI entsprechenden Stelle des Streifens (102).

Die rehydrierten IPG-*strips* wurden mit dem 3100 *Offgel Fractionator* (Agilent, Böblingen, Deutschland) fokussiert.

Hierbei wurden die zu fokussierenden Streifen in jeweils eine Rinne des Fokussierungs-*Tray* gelegt. An jedem Ende des Streifens wurden zur Verbesserung der Kontakte in MilliQ Wasser getränkte *paper wicks* (Electrode Wicks, Bio-Rad) aufgelegt und jede Rinne wurde mit 2,5 ml Silikonöl gefüllt, abermals um eine Austrocknung zu verhindern.

Die Streifen wurden mit insgesamt 6-8 Kilovoltstunden (kVh) fokussiert. Die maximale Spannung von 5000 V wurde jedoch aufgrund hoher Widerstände selten erreicht. Nach Ablauf der Zeit des Fokussierungsprotokolls bzw. nach Erreichen von 8 kVh wurde auf eine *hold*-Spannung von 300 V umgeschaltet. Die Leistung lag bei maximal 250 mW und die Stromstärke war bei 50 μ A limitiert.

Die Fokussierung wurde nach dem Protokoll, das in Abbildung 7 dargestellt ist, ausgeführt:



Abbildung 7: Isoelektrische Fokussierung. Der Zeitstrahl zeigt das Fokussierungsprotokoll in Stunden (h) und die angelegte Spannung in Volt (V). *step* = Spannung wird in einem Schritt eingestellt; *linear* = Spannung wird linear ansteigend aufgebaut; *hold* = Spannung wird auf diesem Niveau gehalten, sobald die maximale kVh Zahl erreicht ist

Nach Abschluss der Fokussierung wurden die Streifen für 12 bis 48 Stunden bei -20 °C eingefroren.

2.5.3.2 2. Dimension, Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Um dies zu erreichen, wird der fokussierte IPG-*strip* auf ein SDS-PAGE-

Gel aufgelegt, abermals eine Spannung angelegt und die Proteine wandern aus dem Streifen in die Gelmatrix. Große Proteine bleiben relativ weit oben in der Polyacrylamidgelmatrix, während kleinere weiter nach unten migrieren.

Die Gele wurden mit 11% PAA (vgl. Tabelle 5) gegossen. Pro Gel wurden zwei Glasplatten (10x10 cm), getrennt durch 1 mm dicke *spacer*, aufeinander gelegt und in die Gießvorrichtung eingespannt. Sobald Temed und APS als Initiatoren der Polymerisationsreaktion hinzugegeben wurden, wurde das flüssige Gel zügig mit einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten gegeben. Nach oben wurde ca. 1 cm für die spätere Applikation der IPG-*strips* ausgespart. Die Geloberfläche wurde mit ca. 500 µl Isopropanol beträufelt, damit eine plane Oberfläche gewährleistet war. Die Gele polymerisierten für ca. 30 Minuten aus und wurden, in feuchte Zellstofftücher gewickelt, bei 4 °C gelagert.

Es schloss sich etwa 12 Stunden nach dem Gießen der Gele die Äquilibration der IPG-*strips* an. Dafür wurde der Gelstreifen, beladen mit 250 µg Protein, zunächst mit DTT behandelt, sodass Disulfidbrücken reduziert wurden. Anschließend wurde Iodacetamid (IAA) hinzugegeben, um durch Alkylierung eine Re-Oxidation der Cysteine zu verhindern. SDS sorgt für eine vollständige Entfaltung der Proteine, indem es an ca. jeder dritten Aminosäure bindet und durch die negative Ladung an den Bindungsstellen ein *Refolding* verhindert.

Die IPG-*strips* wurden in jeweils eine Rinne eines Äquilibrations-Tray (Serva) gelegt. Zunächst wurden 2,5 ml Äquilibrationpuffer (siehe Tabelle 13) mit 1% DTT in jede Rinne des Trays gegeben. Dieses wurde für 15 Minuten geschüttelt. Danach wurde der DTT-haltige Äquilibrationpuffer abpipettiert und durch 2,5 ml Äquilibrationpuffer mit 2,5% IAA ersetzt. Es folgten weitere 15 Minuten auf dem Schüttler.

Tabelle 13: Zusammensetzung Äquilibrationpuffer

Chemikalie	Menge/Volumen
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	33,3 ml
SDS	4 g
Urea	72,07 g
Glycerol	60 ml
Bromphenol Blau	Spatelspitze
MilliQ H ₂ O	200 ml

Die Gele wurden eingespannt und die Laufkammern mit Laufpuffer (siehe Tabelle 7) aufgefüllt.

Sobald die Äquilibration abgeschlossen war, wurden die IPG-*strips* vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Äquilibrations-*Tray* genommen und dreimal kurz in Laufpuffer gewaschen. Auf das eingespannte Gel wurden ca. 800 µl auf 95 °C erhitzte (Rotilabo-Block-Heater H250, Roth) Agaroselösung (vgl. Tabelle 14) pipettiert.

Tabelle 14: Agaroselösung

Chemikalie	Menge
Agarose	1,5 g
Bromphenol Blau	Spatelspitze
SDS-Laufpuffer	ad 300 ml

In die Agaroselösung wurden zügig die IPG-*strips* gebettet, sodass sie glatt und ohne Luftblasen dem Gel auflagen. Außerdem wurden 2 µl Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein Standards Dual Color, BioRad) auf ein *paper wick* gegeben und ebenfalls dem Gel aufgelegt. Der Marker zeigt Proteinbanden bei 250, 150, 100, 75, 50, 37, 20 sowie 15 Kilo-Dalton (kDa). Waren alle Gele beladen, wurde die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Gelkammern wurden verschlossen und an die Stromquelle angeschlossen. Die Anlage wurde auf 10 °C gekühlt.

Zunächst wurde eine Spannung von 40 V für 30 Minuten angelegt, bis die Bromphenolblau-Lauffront komplett in das Gel gewandert war. Nach 30 Minuten wurde die Spannung auf 150 V erhöht und etwa 90 Minuten gehalten, bis die Lauffront am unteren Rand des Gels angelangt war.

Es schlossen sich vier 10-minütige Waschschrte in MilliQ Wasser auf einem Schüttler an, um das SDS herauszuwaschen.

2.5.4 Coomassie Färbung

Nach den Waschschrten wurden die Gele in den Färbeschalen mit etwa 100 ml der Coomassie Brilliant Blue Färbelösung (115,116) übergossen (vgl. Tabelle 15). Mit Hilfe der Coomassie Lösung wurden die Proteine in dem Gel fixiert und angefärbt.

Tabelle 15: Coomassie Färbelösung

Reagenz/Lösung	Menge/Volumen
Coomassie Brilliant Blue	400 mg
Aluminiumsulfat-18-Hydrat	100 g
Ethanol 80%	240 ml
Ortho-Phosphorsäure 85%	47 ml
MilliQ H ₂ O	ad 2000 ml

Aluminiumsulfat wurde zunächst in 1,5 L H₂O gelöst, es wurden Ethanol und Phosphorsäure hinzugegeben, schließlich wurde ad 2000 ml mit H₂O aufgefüllt.

Die Gele wurden für mindestens 12 h in einer Färbeschale geschüttelt, die Färbelösung abgegossen und durch Entfärbelösung (vgl. Tabelle 16) ersetzt. Die Schale wurde abermals für ca. zwei Stunden auf den Schüttler gestellt.

Tabelle 16: Entfärbelösung

Reagenz/Lösung	Menge/Volumen
Ethanol 80%	240 ml
Ortho-Phosphorsäure 85%	47 ml
MilliQ H ₂ O	ad 2000 ml

2.6 Einscannen der Gele

Nachdem die Entfärbelösung durch MilliQ Wasser ersetzt war, wurden die Gele mit dem Amersham Pharmacia Image Scanner (GE Healthcare) eingescannt. Es wurde jeweils ein digitales Bild mit dem Programm LabScan 5.0 (Swiss Institute of Bioinformatics, Genf, Schweiz) erstellt und als „tagged image file“ (.tif)-Datei gespeichert. Die schwarz-weißen Bilder wurden in der Delta 2D Software (Version 4.3.3, Decodon, Greifswald, Deutschland) hochgeladen und für die Auswertung verwendet. Zudem wurde von jedem Gel ein Farbscan angefertigt und zur Dokumentation archiviert.

Die Gele wurden nach dem Scannen in 150 µl 10%iger Essigsäure luftdicht eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

2.7 Analyse differentiell exprimierter *spots*

Die Analyse der Proteinexpression und -regulation anhand der 2D-Gele erfolgte softwarebasiert (Delta 2D Software (Version 4.3.3, Decodon, Greifswald, Deutschland)).

Die Bilder der Gele wurden aufgrund der Datenmenge in drei Projekte unterteilt. Die Einteilung erfolgte nach technischen Replikaten (A, B, C). Die technischen Replikatreihen wurden einzeln ausgewertet und am Ende miteinander verglichen. Jedes der drei Projekte enthielt also 36 Gelbilder. Nur *spots*, welche in allen drei Replikatgruppen statistisch signifikant ($p < 0,03$) reguliert waren, sollten später massenspektrometrisch identifiziert werden. Die durchgeführten Vergleiche sind in Tabelle 17 dargestellt.

Um die Gelbilder miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst Laufunterschiede durch *warping* ausgeglichen. Hierbei wurden alle Gelbilder einer Gruppe digital auf ein *Masterimage* transferiert, sodass sich entsprechende *spots* exakt übereinander lagern. Mit Hilfe des Programms wurde die Intensität der einzelnen *spots* in Volumen Prozent (%Vol) miteinander verglichen. Die statistischen Vergleiche der Gruppen (siehe Tabelle 17) wurden mit dem t-Test durchgeführt.

Tabelle 17: Vergleiche zwischen den Gruppen

Vergleich	Aspekt
SHAM140 vs. SHAM20	Liegezeit
IPC20 vs. SHAM20	direkter Effekt der Präkonditionierung
IPC140 vs. SHAM140	IPC Effekt nach 140 Minuten
IPC140 vs. IPC20	IPC Effekt über die Zeit
IR vs. SHAM140	Veränderungen durch IR-Schaden
IPC-IR vs. IR	Effekt der Präkonditionierung bei IR
IPC-IR vs. IPC140	Effekt IR-Schaden bei IPC

Spots, die beim Vergleich zweier Behandlungsgruppen in allen drei Replikatgruppen signifikant hoch- oder herabreguliert waren, wurden für eine massenspektrometrische Identifikation aus ein bis zwei Gelen herausgeschnitten. In Einzelfällen wurden auch *spots* identifiziert, die nur in zwei Replikatgruppen reguliert

waren, weil in der dritten Gruppe aufgrund von Artefakten eine akkurate Beurteilung nicht möglich war.

2.8 Tryptischer Verdau und massenspektrometrische Identifizierung der Protein *spots*

Der tryptische Verdau sowie die massenspektrometrische Identifizierung der differentiellen *spots* wurden durch Dr. rer. nat. S. Metzger sowie Dipl. Biol. T. Strahl (BMFZ, Analytisches Zentrallabor, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Die Proben wurden an einem *Electrospray-Ionisation Quadrupol-Quadrupol Time-of-Flight* Gerät (ESI-Qq-TOF) (Q-Star XL, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Folgende Schritte sind zur Analyse der Proben notwendig:

1. Proteinauftrennung (2-DE)
2. Protease-Verdau der ausgeschnittenen Protein *spots* (tryptischer Verdau)
3. Entsalzung der Proben
4. Aufnahme eines Übersichtsspektrum der zu messenden Proben
5. Aufnahme von Fragmentspektren verschiedener tryptischer Peptide
6. Identifizierung der Proteine durch Sequenzierung der tryptischen Peptide

2.8.1 Tryptischer im-Gel-Verdau

Die Proteine müssen für die massenspektrometrische Identifikation in Peptide gespalten werden. Hierfür wurde Trypsin verwendet, das spezifisch hinter jedem Arginin und Lysin C-terminal schneidet, mit Ausnahme eines ggf. angrenzenden Prolins.

Tabelle 18: Trypsinverdau, Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Waschlösung I	Ammoniumhydrogencarbonat 25 mM 50% Acetonitril (ACN)
Waschlösung II	100% ACN
Trypsinpuffer	Ammoniumhydrogencarbonat 25 mM (pH 8,0)(gekühlt)
Trypsinlösung	20 µg Trypsin + 200 µl Trypsinpuffer □
Elutionslösung	50% ACN + 5% Ameisensäure + 45% Milli-Q destilliertes H ₂ O

Zunächst wurden die Protein *spots* mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert und in ein 0,5 ml Protein-LoBind silikonisiertes Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Darauf folgten mehrere Waschschrirte. Nach Zugabe von 100 µl Waschlösung I (vgl. Tabelle 18) wurden die Proben für 10 Minuten geschüttelt (Vortex-Schüttler VV3, VVR, Darmstadt, Deutschland). Der Waschlösung wurde abpipettiert und abermals durch 100 µl Waschlösung I ersetzt und erneut für 30 Minuten auf den Schüttler gestellt. Dieses Prozedere wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Probe für 30 Minuten in Waschlösung II (vgl. Tabelle 18) gewaschen, wobei das ACN die Proben vollständig dehydratisiert. Die Proben wurden nach dem Abnehmen des Waschlösung II für 30 Minuten Vakuum-getrocknet (Concentrator 5301, Eppendorf).

Die getrockneten Gelstückchen wurden mit Trypsinlösung (vgl. Tabelle 18) bedeckt, sodass sie sich komplett vollsaugten. Nach ca. 5 Minuten wurde die überschüssige Trypsinlösung abgenommen und die Gelstücke mit Trypsinpuffer (vgl. Tabelle 18) übergossen. Sie wurden 12-16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bis zur Inkubation wurde die trypsinhaltige Probe auf Eis gehandhabt, um einen Eigenverdau des Trypsins zu vermeiden.

Zur Elution der Peptide wurden die Gelstücke herunterzentrifugiert (Rotilabo Minizentrifuge, Roth) und der peptidhaltige Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Zur Überführung der Überstände wurden Gelloader-Pipettenspitzen (Eppendorf) verwendet. Das Gefäß wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden fünf Minuten auf den Vortex-Schüttler gestellt und für fünf Minuten mit Ultraschall (Bandelin electronic) behandelt. Abermals wurden die Gelstücke herunterzentrifugiert und der Überstand in das neue Gefäß überführt. Die Proben wurden mit Elutionslösung (vgl. Tabelle 18) vermischt, so dass sie vollständig bedeckt waren, für 30 Minuten auf den Vortex-Schüttler gestellt und danach der Überstand in das neue Gefäß transferiert. Dieser Schritt wurde zweimalig wiederholt. Danach wurden die Proben einmalig in ACN für 30 Minuten auf dem Vortex-Schüttler belassen und der Überstand abermals in das neue Gefäß mit den eluierten Peptiden überführt. Das Gefäß mit den Peptiden wurde bis zur Trocknung in die Vakuum-Zentrifuge gegeben und bei -20 °C eingefroren.

2.8.2 Entsalzen der Peptide

Dem tryptischen Verdau schloss sich eine Entsalzung der Peptide an, da Salze die MS-Analyse durch ihre Ladung stören können.

Tabelle 19: Entsalzungslösungen

Puffer	Zusammensetzung
Waschlösung	4% Methanol/ 1% Ameisensäure
Elutionslösung	60% Methanol/ 1% Ameisensäure

Die Entsalzung wurde in Pipettenspitzen mit einer C₁₈ Matrix (ZipTip, Millipore, Bedford, USA) durchgeführt.

Die Proben wurden mit 10 µl Waschlösung (vgl. Tabelle 19) aufgenommen. Die Pipettenspitzen wurden durch dreimaliges Aufziehen und Verwerfen von 10 µl Elutionslösung (vgl. Tabelle 19) aktiviert und danach durch ebenfalls dreimaliges Aufziehen und Verwerfen von Waschpuffer äquilibriert. Die Probe wurde mit der Pipettenspitze aufgenommen und mehrmals luftblasenfrei auf- und abgezogen, sodass die Peptide an die C₁₈ Matrix der Pipettenspitze binden. Es schlossen sich erneut drei Waschschrte mit je 10 µl Waschlösung an. Darauffolgend wurden die Peptide von der C₁₈-Säule durch mehrmaliges auf- und abziehen in 10 µl Elutionslösung gelöst und in ein neues Gefäß gefüllt.

2.8.3 Electrospray Ionisations Massenspektrometrie

Bei massenspektrometrischen Verfahren werden geladene Teilchen, in diesem Fall Peptide, nach ihrem Masse zu Ladung (m/z) Verhältnis aufgetrennt. Bei bekannter Ladung lässt sich die Masse ermitteln. Es gibt verschiedene Methoden der MS. Das Prinzip besteht darin, dass man eine Ionenquelle nutzt, welche eine ionisierte Probe in einen Massenanalysator bringt, dem sich ein Detektor anschließt.

Das Verfahren der Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde 1988 von John Fenn entwickelt (117).

Die Analytmoleküle werden in einem sauren oder basischen Puffer gelöst und erhalten dadurch eine Ladung. Das erklärt die Bedeutung der vorangehenden Entsalzung. Natriumionen würden an die zu protonierenden Bindungsstellen binden und die Massenanalyse stören.

Die zu analysierende Proteinlösung wird beim Prozess der Desolvatisierung mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes bei atmosphärischem Druck in viele kleine geladene Tröpfchen zerstäubt. Dafür wurden die Proben in eine metallbedampfte Glaskapillare (Proxeon, Odense, Dänemark) aufgenommen, an die eine Spannung angelegt wird. In dieser Arbeit wurde ein Tandem-Hybrid-Massenspektrometer (Q-STAR XL ESI-Qq-TOF) verwendet. Es besteht aus drei hintereinandergeschalteten Quadrupolen (Triplequadrupol) und einem *Time-of-Flight* (TOF)-Analysator zur Massenselektion. Die Quadrupole bestehen aus vier, dreidimensional angeordneten und parallel verlaufenden Metallelektroden. Die jeweils gegenüberliegenden sind gleich gepolt. Mit definierten Gleich- und Wechselspannungen zwischen den Elektroden werden durchfliegende Ionen (hier geladene Peptide) mit einem bestimmten m/z Verhältnis auf einer oszillierenden Flugbahn stabilisiert. Moleküle mit einem anderen m/z Verhältnis kollidieren mit den stabförmigen Elektroden, sodass die Peptide mit stabiler Flugbahn selektioniert werden.

Die drei Quadrupole des Q-Star XL Massenspektrometers haben unterschiedliche Funktionen. Im Ersten wird der Strahl der Ionen gebündelt. Im Zweiten findet die eigentliche Selektion nach m/z statt. Das dritte Quadrupol fungiert als Kollisionszelle. Hier werden Peptide mit definiertem m/z Verhältnis mit einem Inertgas (Stickstoff) beschossen, so dass sie zerbrechen.

Im TOF-Analysator erfolgt die Auftrennung der Fragmente nach ihrem m/z -Verhältnis. Mit den ermittelten Massen der Aminosäurefragmente lässt sich die Peptidsequenz rekonstruieren.

2.8.4 Proteinidentifikation

Es wurde zunächst ein Übersichtsspektrum der Peptide erstellt. Im zweiten Schritt wurden die Peptide sequenziert. Die Sequenzen wurden nach dem Mascot Algorithmus (<http://www.Matrixscience.com>) ausgewertet und mit der NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) abgeglichen. Um ergänzend Hinweise auf die Proteine zu erhalten, wurde zudem der *Peptide Mass Fingerprint* verwendet. Dabei werden die erhaltenen Peptidmassen aus dem Übersichtsspektrum mit den theoretisch beim Verdau des fraglichen Proteins entstehenden Peptiden verglichen.

Bei der Erstellung des Übersichtsspektrums wurden die Quadrupole so eingestellt, dass alle Peptidionen in einem Massenbereich von 350 bis 1200 Da zum Detektor gelangen. Die Protonierung erfolgt an basischen Seitenketten (Lysin, Arginin, Histidin) sowie am N-Terminus des Peptids. Da bei der Protonierung nicht beeinflusst werden kann, wie viele H^+ -Ionen ein Peptid aufnimmt, können unterschiedliche Signale am Detektor von demselben Peptid stammen. Mit Hilfe der Kenntnis natürlich vorkommender Isotopenverteilung (z.B. Kohlenstoff: ^{13}C und ^{12}C) lässt sich jedoch die Ladung errechnen.

Die Aminosäuresequenz einzelner Peptide aus dem Übersichtsspektrum wurde über die Fragmentierung dieser Peptide ermittelt.

Dazu wurde ein zu sequenzierendes Peptid in der Kollisionszelle durch Kollision mit Stickstoffmolekülen fragmentiert. Die Brüche finden an den Bindungsstellen zwischen den einzelnen Aminosäuren statt. Die Nomenklatur der entstehenden Fragmente richtet sich nach dem Verbleib der Ladung (118). Verbleibt diese am N-Terminus ist von der a-, b- bzw. c-Serie die Rede, während eine Ladung am C-terminalen Ende als x-, y-, z-Serie bezeichnet wird. In dieser Arbeit überwogen Peptide der y-Serie, da Trypsin C-terminal hinter Lysin sowie Arginin schneidet und die Ladung am C-Terminus verbleibt (vgl. Abbildung 8).

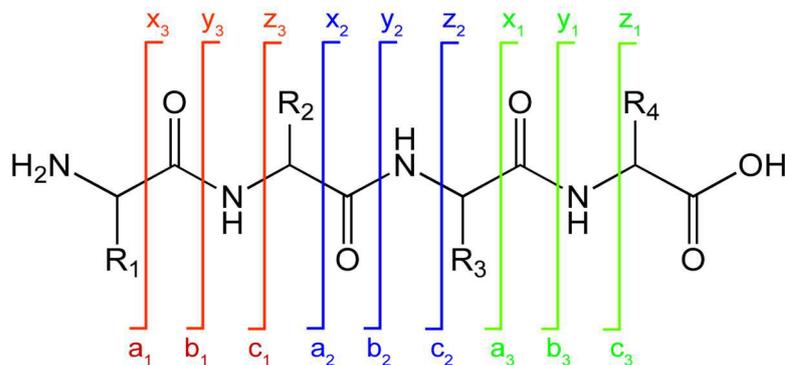


Abbildung 8: Nomenklatur der Peptidfragmente nach Roepstorff und Fohlman (118). Die Nomenklatur der aus dem Zusammenstoß der Aminosäuren mit Stickstoff entstehenden Fragmente richtet sich je nach Verbleib der Ladung am C- oder N-Terminus. Es gibt es eine a-, b- bzw. c-Serie (C-Terminus) oder eine x-, y- oder z-Serie (N-Terminus).

Findet ein solcher Bruch statt, erhält man im Massenspektrum Signale mit unterschiedlichen m/z Werten. Einzelne Aminosäuren werden abgespalten. Die Massendifferenz zum Ursprungspeptid entspricht diesen Aminosäuren. Da die einzelnen Aminosäuren eine unterschiedliche spezifische Masse besitzen (mit

Ausnahme von Leucin und Isoleucin), lässt sich aus dem Fragmentspektrum die Aminosäuresequenz des Peptides ablesen/bestimmen.

Für die Proteinidentifizierung wurden im Durchschnitt in dieser Arbeit fünf Peptide sequenziert und mit den Datenbanken abgeglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der Leberschädigung anhand der Transaminasen

Im Serum der operierten Tiere zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Transaminasen AST sowie ALT in den Versuchsgruppen IR und IPC-IR beim Vergleich mit der scheinoperierten SHAM140-Gruppe ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 9). Auch bestätigte sich ein signifikanter Abfall von ALT und AST nach IPC im Vergleich zu IR ($p < 0,05$; vgl. Abbildung 9).

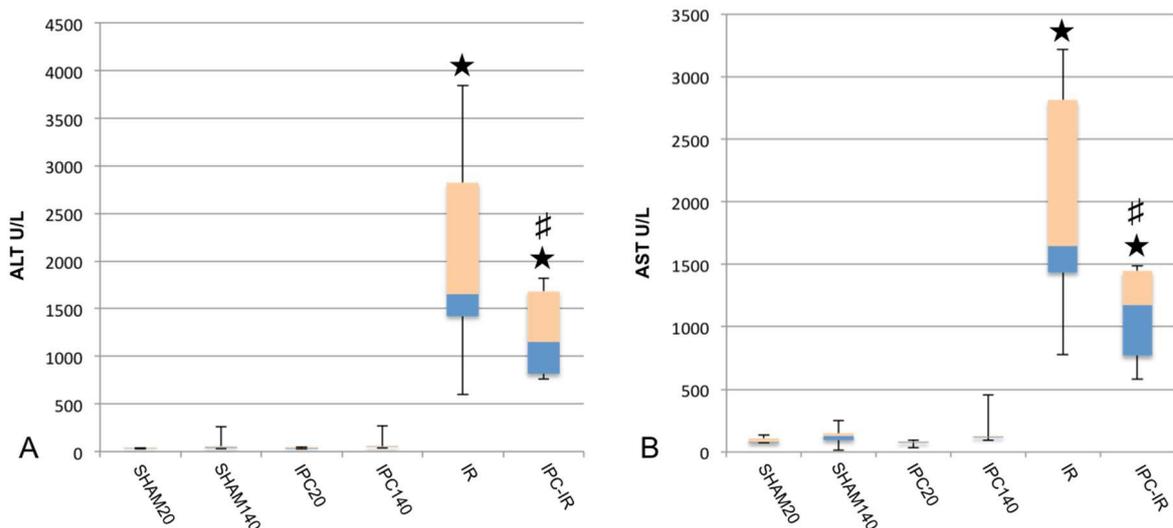


Abbildung 9: Darstellung der Transaminasen Level. A=ALT-Level, B=AST-Level im Serum der Versuchstiere nach Behandlungsgruppen. Oberer und unterer *Whisker* stellen die Extremwerte der Transaminasen dar. Oberes und unteres Ende der *Box* repräsentieren respektive 75. und 25. Perzentile dar. Der Übergang zwischen den Farben entspricht dem Median; $n=6$ /Gruppe; *= $p < 0,05$ vs. SHAM140. #= $p < 0,05$ vs. IR.

3.2 Western Blots zur Überprüfung des Fraktionierungsprotokolls

Um zu verifizieren, dass die zytosolische Zellfraktion einen hohen Reinheitsgrad hat, wurden vier Western Blots durchgeführt (siehe Abbildung 10).

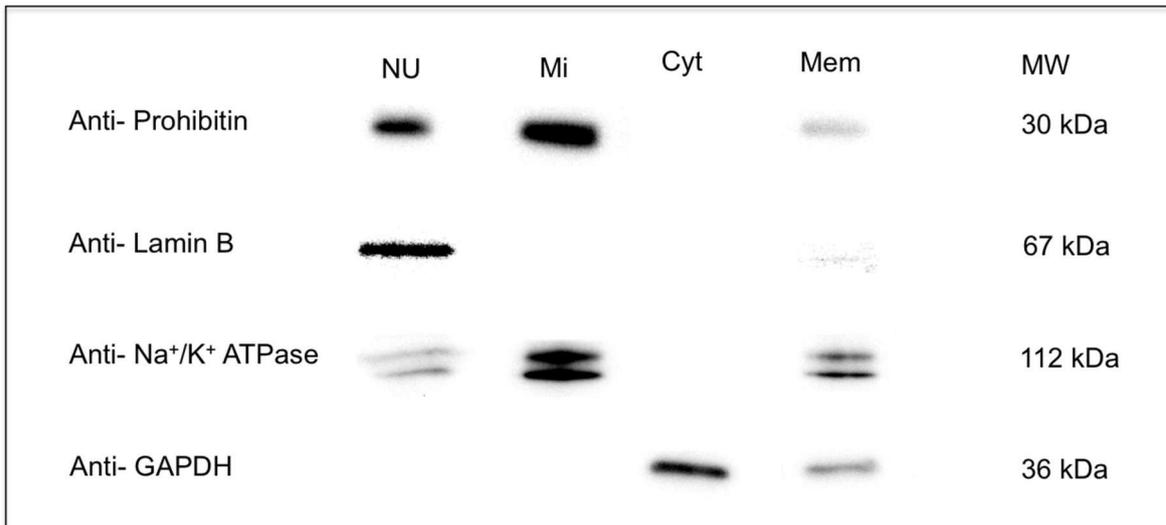


Abbildung 10: Zusammenfassung Western Blot Ergebnisse. Zu sehen sind die *Overlays* der vier Western Blots. Es zeigt sich ein Signal des Anti-GAPDH-Antikörpers in der Zytosolfraktion; Die anderen Antikörper zeigten keine Bindungen in der zytosolischen Fraktion. NU=nukleäre Fraktion, Mi=mitochondriale Fraktion, Mem=Membranfraktion, MW=Molekulargewicht

Es zeigte sich ein starkes GAPDH-Signal in der zytosolischen Fraktion. Es zeigte sich keine Reaktion der Zytosolfraktion mit einem gegen Proteine anderer Fraktionen gerichteten Antikörper (siehe Abbildung 10). Dies deutet auf einen hohen Reinheitsgrad der zytosolischen Fraktion hin.

3.3 Optimierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Eine saubere und reproduzierbare Auftrennung der Proteine ist für eine akkurate komparative Proteomanalyse essentiell. Um dies zu gewährleisten, war es zunächst notwendig, beide Dimensionen der 2-DE zu optimieren und ein Protokoll zu etablieren, das eine gute Vergleichbarkeit der Gele ermöglicht.

3.3.1 Optimierung der 1. Dimension

Die Fokussierung nach pI sollte insbesondere im sauren pH -Bereich (~ 4) reproduzierbar erfolgen. Mit dem vom Hersteller des 3100 *Offgel Fractionator* empfohlenen Protokoll konnte im sauren Bereich keine saubere Auftrennung der Proteinspots erreicht werden. Folglich war eine akkurate Analyse nicht möglich.

Eine Anpassung des Protokolls der IEF ermöglichte es, eine verbesserte Proteinauftrennung in diesem Bereich zu erzielen.

Es zeigte sich, dass durch eine Verlängerung der Anlaufphase bei 300 V von 30 Minuten auf vier Stunden (siehe Abbildung 11), eine wesentlich bessere Auftrennung

der Proteine im sauren pH-Bereich erreicht wurde. Insgesamt wurde weiterhin mit sechs bis acht kVh fokussiert. Wenn diese erreicht waren, wurde auf eine *hold* Spannung von 300 V umgestellt.

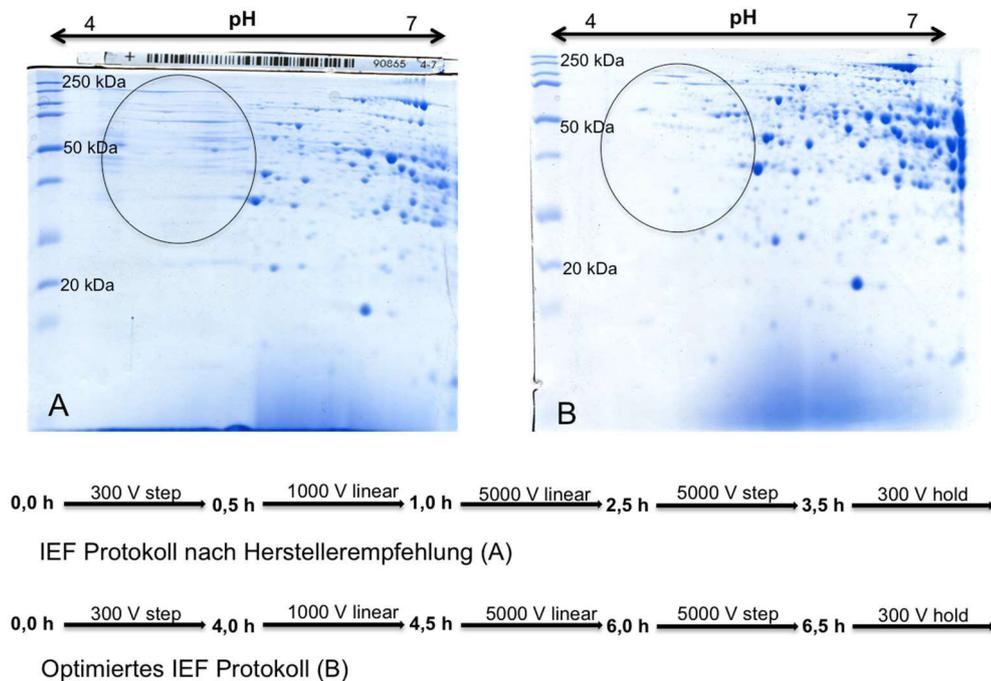


Abbildung 11: Anpassung des IEF Protokolls. Durch eine Verlängerung der Anlaufzeit bei 300 V wurde eine verbesserte Auftrennung im sauren pH-Bereich (Kreis) erreicht. A=exemplarisches Gel nach vom Hersteller empfohlenem IEF Schema; B= exemplarisches Gel nach optimiertem IEF Schema; Vom Hersteller empfohlenes und optimiertes IEF Schema sind unter den beiden Coomassie gefärbten Gelen als Zeitstrahl dargestellt. *step*=die Spannung wird sofort eingestellt; *linear*=Spannung wird linear ansteigend aufgebaut; *hold*=Spannung nach Ablauf des Protokolls

Es zeigte sich zudem eine klarere Diskriminierung der Proteine bei Verwendung von 1% *carrier* Ampholyten im Rehydrierungspuffer. Initial wurde mit einem 2%igen Puffer gearbeitet. Auch diese Änderung wurde für die 2-DE in dieser Studie übernommen.

3.3.2 Optimierung der 2. Dimension

Zur Proteinauftrennung der Proben nach MW mittels SDS-PAGE wurden unterschiedliche Polyacrylamidkonzentrationen der Gele sowie unterschiedliche Proteinmengen getestet.

Zunächst wurde die geeignete PAA-Konzentration bestimmt. Bei hoher PAA-Konzentration ist die Gelmatrix dichter und die Proteine migrieren entsprechend langsamer, große Proteine sistieren weiter oben im Gel. Bei niedriger PAA-

Konzentration wandern die Proteine schneller. Dadurch erreicht man eine bessere Auftrennung, läuft aber auch Gefahr, kleinere Proteine zu verlieren.

Es wurden 10%ige, 11%ige sowie 12%ige Gele getestet (siehe Abbildung 12). Gele mit 11%igem PAA Anteil zeigten sich als am besten geeignet, da die Proteine bei 11% PAA besser aufgetrennt werden als bei 12% PAA, die Matrix aber fester ist und die Gele damit besser handhabbar sind als 10%ige Gele.

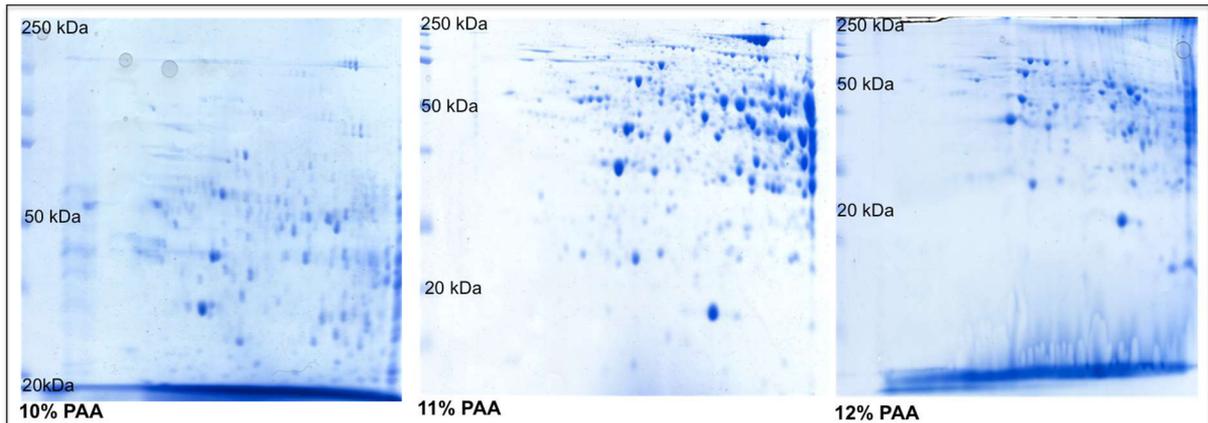


Abbildung 12: Proteinauftrennung bei unterschiedlichen PAA-Konzentrationen zur Optimierung der 2-DE Gele. In den 11%igen PAA Gelen ergibt sich eine übersichtliche Verteilung der Proteine bei guter Handhabbarkeit. Am linken Rand der Gele sind die Markerbanden bei 20, 50 und 250 kDa beschriftet.

Weiterhin wurde die Beladung mit verschiedenen Proteinmengen getestet. Nach der Erstellung und Auswertung von 2-DE Gelen mit 200 µg, 250 µg, 300 µg sowie 400 µg Protein wurde die Versuchsreihe mit 250 µg Protein je Gel ausgeführt, da bei dieser Menge eine gute Auftrennung und Differenzierbarkeit der Proteinspots gegeben war. Gering abundante Proteine ließen sich abgrenzen, ohne dass eine zu große Proteinmenge die Differenzierung einzelner Proteinspots voneinander erschwerte.

3.4 Detektion differentiell exprimierter spots

Die Bilder der eingescannten Gele wurden mit Hilfe der Delta 2-D Software miteinander verglichen, um differentiell exprimierte *spots* (DS) zu detektieren. Jede technische Replikatgruppe (A, B und C) mit jeweils 36 Gelbildern wurde einzeln ausgewertet und mit den anderen beiden Replikatgruppen verglichen. Insgesamt wurden auf Gelen der technischen Replikate A und B 787 Proteinspots und bei den Replikaten C 784 *spots* pro Gel detektiert. Die Differenz ergibt sich durch Artefakte (z.B. Luftblasen), die von der Software als *spots* gewertet wurden.

War ein *spot* beim Vergleich zweier Behandlungsgruppen (siehe Tabelle 17) in einer Replikatgruppe signifikant ($p < 0,03$) reguliert, wurde mit den anderen Replikatreihen abgeglichen, ob der entsprechende *spot* dort ebenfalls signifikant reguliert war. War dies der Fall, wurde der *spot* für eine massenspektrometrische Identifizierung ausgeschnitten. Lediglich die *spots* DS1 sowie DS5a wurden berücksichtigt, obwohl sie nicht in allen Replikatreihen reguliert waren, weil diese aufgrund von Fehlern bei der *spot* Detektion bzw. Auftrennung in nur einer Replikatreihe als nicht signifikant reguliert erfasst wurden.

Insgesamt zeigten sich acht *spots*, die bei den angestellten Vergleichen in allen drei technischen Replikatreihen differentiell exprimiert waren (vgl. Abbildung 13). Zwei der *spots* waren beim Vergleich der Gruppen IPC-IR und IPC140 reguliert, fünf beim Vergleich von IPC20 mit IPC140, einer beim Vergleich von SHAM20 mit SHAM140 und einer beim Vergleich zwischen SHAM20 und IPC20.

Der *spot* DS5 war beim Vergleich zwischen IPC20 und IPC140 (DS5a) in zwei Replikatreihen signifikant reguliert und beim Vergleich zwischen SHAM20 und SHAM140 in allen drei technischen Replikatreihen differentiell exprimiert (DS5b).

In Abbildung 13 sind die differentiell exprimierten *spots* (DS1-8) in einer Übersicht auf einem repräsentativen 2D-Gel dargestellt.

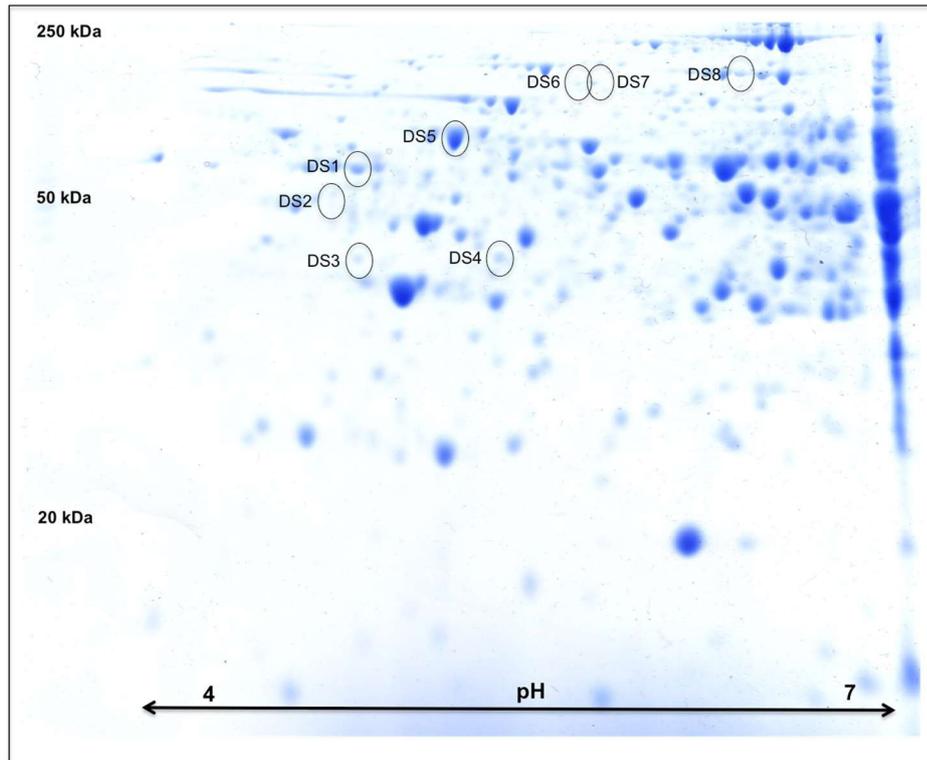


Abbildung 13: Übersicht differentiell exprimierter spots. Zu sehen ist ein repräsentatives Coomassie gefärbtes 2-D Gel mit einem pH-Gradienten von 4-7. Die Markerbanden sind bei 20, 50 und 250 kDa beschriftet. Die differentiellen spots sind schwarz umkreist. DS=differentiell exprimierter spot; $p < 0,03$

Die Expressionsstärken der differentiell exprimierten spots (DS1-8) in %Vol sind in Tabelle 20 aufgeführt. Es wurde ein Mittelwert der Intensitäten aus den drei technischen Replikatgruppen berechnet. Zudem ist die relative Standardabweichung (RSD) angegeben. Die *Ratio* gibt den Quotienten der spot-Intensitäten der verglichenen Gruppen an, also die relative Expressionsveränderung. Die Einzelwerte jedes spots und jeder Replikatreihe finden sich im Anhang zu dieser Arbeit.

Tabelle 20: Differentiell exprimierte Proteinspots

Spot	Intensität (%Vol)	RSD	Intensität (%Vol)	RSD	Ratio
DS1	0,513 (IPC140)	10,33	0,377 (IPC-IR)	16,00	0,74 ↓
DS2	0,026 (IPC140)	36,73	0,061 (IPC-IR)	33,85	2,36 ↑
DS3	0,107 (IPC20)	19,29	0,058 (IPC140)	21,91	0,54 ↓
DS4	0,219 (IPC20)	52,71	0,032 (IPC140)	31,40	0,14 ↓
DS5a	1,399 (IPC20)	22,00	1,768 (IPC140)	6,83	1,48 ↑
DS5b	1,242 (SHAM20)	25,74	1,936 (SHAM140)	18,34	1,57 ↑
DS6	0,042 (IPC20)	40,32	0,008 (IPC140)	75,91	0,18 ↓
DS7	0,037 (IPC20)	30,91	0,011 (IPC140)	72,90	0,30 ↓
DS8	0,136 (SHAM20)	40,72	0,318 (IPC20)	23,25	2,45 ↑

Die einzelnen differentiell exprimierten *spots* (DS1-DS8), die auf den Gelen der drei technischen Replikatgruppen detektiert wurden, sind in den Abbildungen 14 bis 22 dargestellt. Dort werden die signifikant regulierten Proteinspots aus jedem einzelnen für den Vergleich (z.B. SHAM20 vs. IPC20) verwendeten Gel präsentiert. Insgesamt werden 36 *spots* aus 36 verschiedenen Gelen in jeder Abbildung gezeigt (sechs biologische Replikate pro Behandlungsgruppe und drei technische Replikate pro biologischem Replikat). Die Balkendiagramme am rechten Rand stellen exemplarisch die *spot*-Intensität in %Vol aus der technischen Replikatreihe A dar.

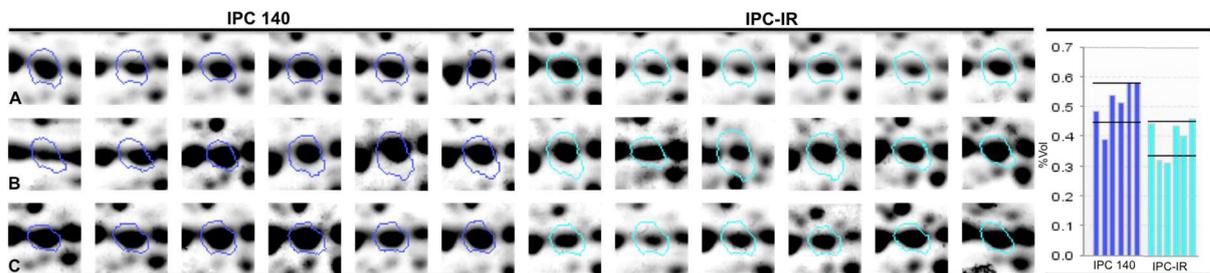


Abbildung 14: Differenzieller spot 1. Dargestellt ist der *spot* DS1 in allen Gelen der Behandlungsgruppen IPC140 sowie IPC-IR aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C); DS1 ist beim Vergleich der Gruppe IPC140 mit IPC-IR in IPC-IR in der A- und C-Replikatreihe signifikant herabreguliert. In der B-Replikatreihe war diese Regulierung aufgrund unsauberer Auftrennung in einem Gel nicht zu verzeichnen. Für die Berechnung der Änderung der Expressionsstärke in %Vol wurden nur die Intensitäten der signifikanten Replikatreihen verwendet; Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

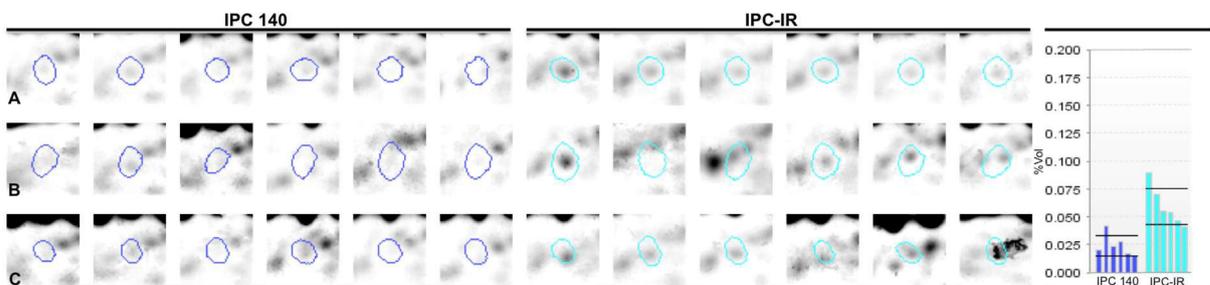


Abbildung 15: Differenzieller spot 2. Dargestellt ist der *spot* DS2 in allen Gelen der Behandlungsgruppen IPC140 sowie IPC-IR aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS2 ist beim Vergleich der Gruppe IPC140 mit IPC-IR in IPC-IR signifikant hochreguliert. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

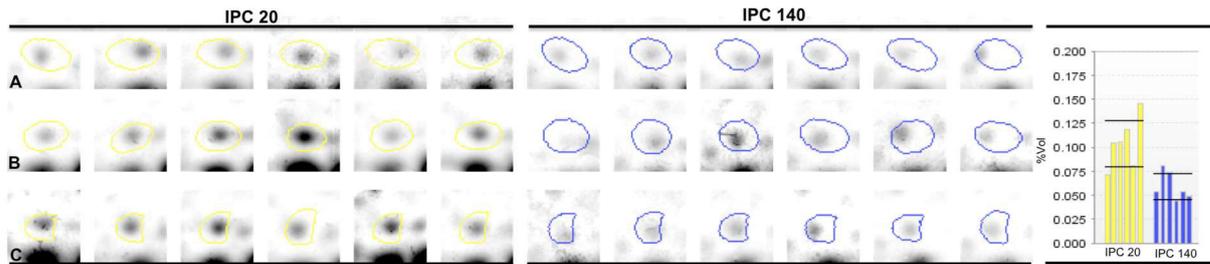


Abbildung 16: Differenzieller spot 3. Dargestellt ist der *spot* DS3 in allen Gelen der Behandlungsgruppen IPC20 sowie IPC140 aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS3 ist beim Vergleich der Gruppe IPC20 mit IPC140 in IPC140 signifikant herabreguliert. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

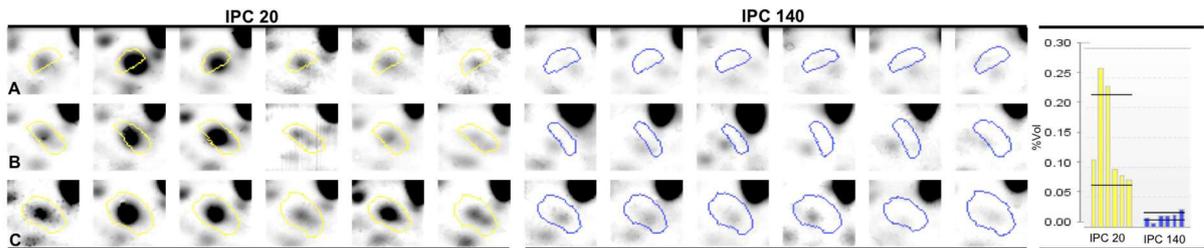


Abbildung 17: Differenzieller spot 4. Dargestellt ist der *spot* DS4 in allen Gelen der Behandlungsgruppen IPC20 sowie IPC140 aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS4 ist beim Vergleich der Gruppe IPC20 mit IPC140 in IPC140 signifikant herabreguliert. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

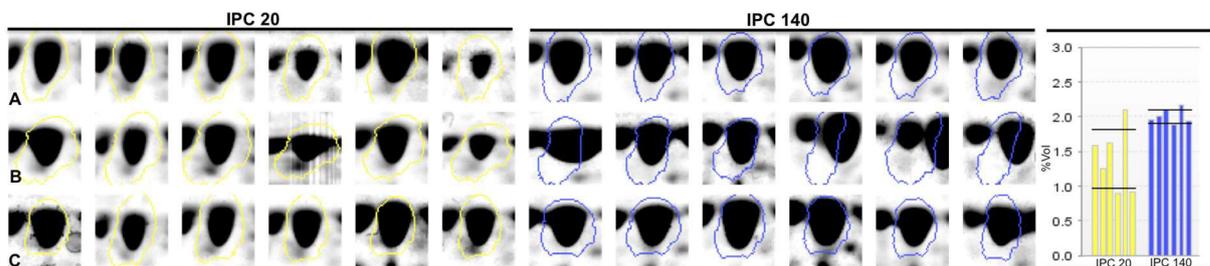


Abbildung 18: Differenzieller spot 5a. Dargestellt ist der *spot* DS5a in allen Gelen der Behandlungsgruppen IPC20 sowie IPC140 aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS5a ist beim Vergleich der Gruppe IPC20 mit IPC140 in IPC140 signifikant hochreguliert. Aufgrund einer fehlerhaften *spot*-Detektion sind bei DS5a nur die technischen Replikate der Gruppen A und C in IPC140 gegenüber IPC20 hochreguliert. Es wurden für die Berechnung der Änderung der Expressionsstärke in %Vol nur die Intensitäten der signifikanten Replikatreihen verwendet. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

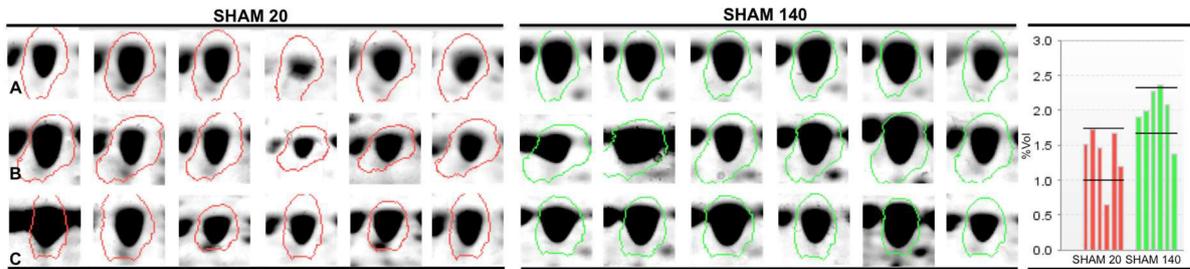


Abbildung 19: Differenzieller spot 5b. Dargestellt ist der *spot* DS5b in allen Gelen der Behandlungsgruppen SHAM20 sowie SHAM140 aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS5b ist beim Vergleich der Gruppe SHAM20 mit SHAM140 in SHAM140 signifikant hochreguliert. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

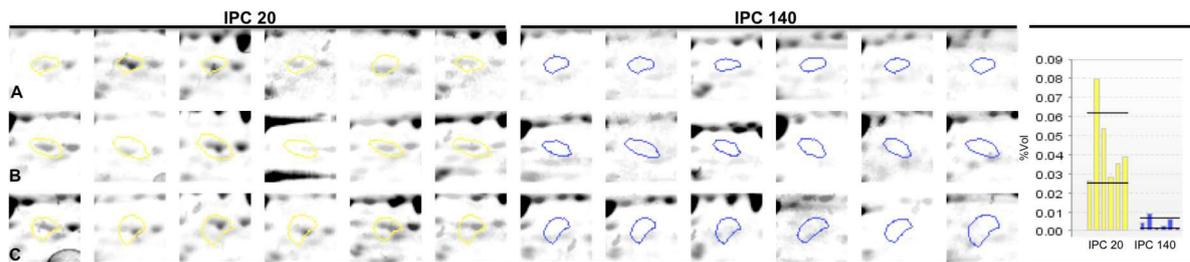


Abbildung 20: Differenzieller spot 6. Dargestellt ist der *spot* DS6 in allen Gelen der Behandlungsgruppen IPC20 sowie IPC140 aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS6 ist beim Vergleich der Gruppe IPC20 mit IPC140 in IPC140 signifikant herabreguliert. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

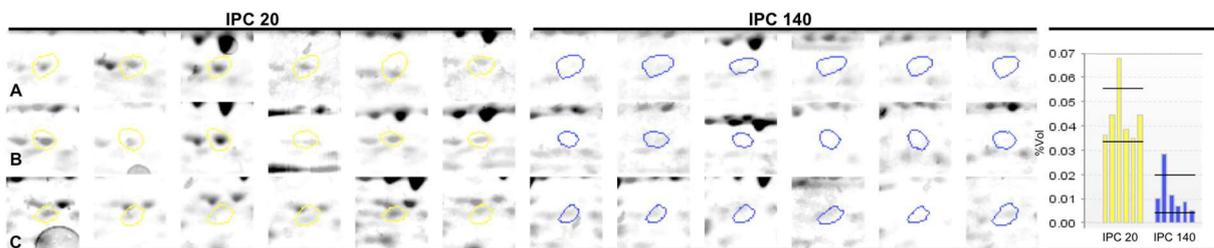


Abbildung 21: Differenzieller spot 7. Dargestellt ist der *spot* DS7 in allen Gelen der Behandlungsgruppen IPC20 sowie IPC140 aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS7 ist beim Vergleich der Gruppe IPC20 mit IPC140 in IPC140 signifikant herabreguliert. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

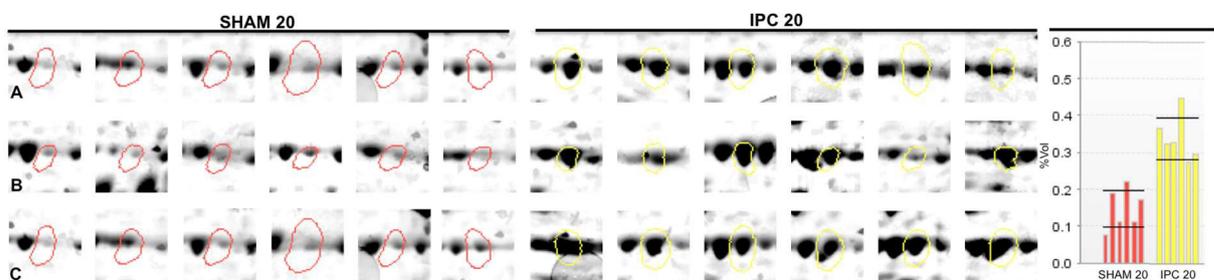


Abbildung 22: Differenzieller spot 8. Dargestellt ist der *spot* DS8 in allen Gelen der Behandlungsgruppen SHAM20 sowie IPC20 aus allen drei technischen Replikatgruppen (A, B, C). DS8 ist beim Vergleich der Gruppe SHAM20 mit IPC20 in IPC20 signifikant hochreguliert. Im Balkendiagramm ist exemplarisch die Expression der einzelnen *spots* aus der technischen Replikatreihe A in %Vol dargestellt. Die waagerechten Striche im Balkendiagramm symbolisieren die Standardabweichung.

3.5 Massenspektrometrisch identifizierte Proteine

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse wurden die in Tabelle 21 gelisteten Proteine identifiziert. Sie sind dort mit der zugehörigen *spot*-Bezeichnung (DS1-8) aufgeführt. Auf der Internet Datenbank www.uniprot.org lassen sich alle Proteine mit ihrer *Search Entry* Nummer (vgl. Tabelle 21) aufrufen.

Tabelle 21: Identifizierte Proteine

Spot	Protein	MW(kDa)/ pI theor.	MW(kDa)/ pI geschätzt	Entry	Vergleich	
DS1*	α -Tubulin	⊙	~50,0/~5,2	⊙	IPC-IR/IPC140	↓
DS2**	Protein-Disulfid- isomerase A6 (PDIA6)	48,17/5,00	~50,0/~5,0	Q63081	IPC-IR/IPC140	↑
	Ektonukleosid- Triphosphat- Diphosphohydro- lase 5 (ENTPD5)	47,37/5,08		Q6P6S9		
DS3	<i>Protein SEC 13 homolog</i>	35,55/5,15	~35,0/~5,1	Q5XFW8	IPC140/ IPC20	↓
DS4***	Aktin	⊙	~40,0/~6,0	⊙	IPC140/ IPC20	↓
DS5	<i>Heat Shock Protein 60 (HSP 60)</i>	60,96/5,91	~60,0/~5,9	P63039	SHAM140/SHAM 20 IPC140/ IPC20	↑ ↑
DS6	<i>Programmed cell death 6 interacting Protein (PDCD6IP)</i>	96,63/6,15	~100,0/~6,2	Q9QZA2	IPC140/ IPC20	↓
DS7****	⊙	⊙	~100,0/~6,3	⊙	IPC140/ IPC20	↓
DS8	Sarkosindehydro- genase (SarDH)	101,44/6,15	~100,0/~6,5	Q64380	IPC20/SHAM20	↑

In der Tabelle sind die identifizierten Proteine mit korrelierenden *spots* (DS1-8) aufgelistet. Zudem sind theoretisches Molekulargewicht (MW) in kDa und theoretischer pI (laut Datenbank) sowie im 2D-Gel abgeschätztes MW und abgeschätzter pI dargestellt. Der *Entry Code* ermöglicht das schnelle Abrufen des Proteins auf der Datenbank www.uniprot.org. Die Pfeile symbolisieren Herauf- bzw. Herabregulierung des Proteins im jeweiligen Vergleich. ⊙ = keine Angabe

*Bei der Identifizierung von DS1 ergab ein *Alignment* der Sequenzen der Untereinheiten des α -Tubulin keine eindeutigen Sequenzabschnitte, sodass eine Zuordnung des α -Tubulin Subtyps nicht möglich war.

**Der *spot* DS 2 enthielt zwei Proteine

***Beim *Alignment* der Aminosäuresequenzen ergaben sich keine eindeutigen Abschnitte, so dass eine genaue Zuordnung nicht möglich war.

****Der *spot* DS7 ließ sich nicht identifizieren

α -Tubulin (DS1)

α -Tubuline sind eine Untergruppe der Tubuline, einer Familie von globulären Proteinen. Der genaue Subtyp der α -chain konnte nicht bestimmt werden. Zusammen mit einem β -Tubulin Dimer formen α -Tubuline die Mikrotubuli, welche wiederum Hauptbestandteil des Zytoskeletts sind (119). Dieses Protein war in zwei von drei technischen Replikatreihen beim Vergleich zwischen IPC140 und IPC-IR in IPC-IR herabreguliert.

Protein-Disulfidisomerase A6 (*Calcium Binding Protein 1*) (DS2)

Die Protein-Disulfidisomerase A6 (PDIA6) ist ein 440 Aminosäuren langes Protein und Teil der Protein-Disulfid-Isomerase Familie (PDI) und wird auch *Calcium Binding Protein 1* genannt. PDIs fungieren unter anderem als Chaperone, die im Rahmen der Proteinfaltung eine wichtige Rolle beim Arrangement von Disulfidbrücken spielen. Die subzelluläre Lokalisation ist im ER (120). PDIA6 war beim Vergleich zwischen IPC140 und IPC-IR in IPC-IR hochreguliert.

Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 5 (ENTPD5) (DS2)

Dieses Protein (auch Guanosin oder Uridin Diphosphatase genannt) ist 427 Aminosäuren lang und in die N-Glykosylierung von Proteinen sowie die Regulierung zellulärer ATP Level involviert. ENTPD5 ist Teil eines Hydrolyse-Zyklus bei dem ATP zu AMP konvertiert wird. Dies führt kompensatorisch zu einer gesteigerten aeroben Glykolyse im Zytosol. Subzelluläre Lokalisation ist das ER (121,122). Das Protein war beim Vergleich zwischen IPC140 und IPC-IR in IPC-IR hochreguliert.

Protein SEC 13 homolog (DS3)

Das 322 Aminosäuren lange Protein SEC 13 homolog ist vor allem bei zellulären Transportmechanismen bedeutsam. Es ist Bestandteil des *Nuclear pore complex* (NPC), welcher als Verbindungsstelle zwischen Nukleus und Zytosol fungiert. SEC 13 dient hier als *shuttle*. Außerdem ist es in die Biogenese von *coat protein complex II* (COPII) *coated vesicles* involviert und in der Membran des ER lokalisiert (123). Dieses Protein war im Verlauf der IPC beim Vergleich zwischen IPC20 und IPC140 nach 140 Minuten herabreguliert.

Aktin (DS4)

Aktin ist Bestandteil der Mikrofilamente und damit des Zytoskeletts. Der Subtyp (G-Aktin, F-Aktin) ließ sich nicht weiter bestimmen. Der Proteinspot DS4 war beim Vergleich zwischen IPC20 und IPC140 nach 140 Minuten herabreguliert.

Heat Shock Protein 60 (HSP 60) (DS5)

HSP 60 oder 60 kDa-Chaperonin ist ein Protein aus der mitochondrialen Matrix und Bestandteil der Chaperonin Familie. Es spielt sowohl beim Import von Molekülen vom Zytosol in die Mitochondrien als auch bei der Verhinderung von *misfolding* eine Rolle. Außerdem wird dem 573 Aminosäuren langen Protein eine wichtige Funktion bei der zellulären Stressantwort zugeschrieben (124).

HSP 60 war bei den scheinoperierten Tieren der Gruppe SHAM140 im Vergleich zu den SHAM20 Tieren nach 140 Minuten hochreguliert. Ebenso war es beim Vergleich zwischen IPC20 und IPC140 nach 140 Minuten in zwei von drei technischen Replikatreihen signifikant hochreguliert.

Programmed cell death 6 interacting Protein (PDCD6IP) (DS6)

PDCD6IP oder *Apoptosis linked gene 2 interacting Protein 1* ist ein 873 Aminosäuren zählendes Protein, das vor allem im Zytosol vorkommt. Es sind zahlreiche Interaktionen mit Proteinen beschrieben, die eine Rolle im *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) und bei der Zytokinese spielen. Eine Überexpression zeigt eine antiapoptotische Wirkung (125–127). Das Protein war im Laufe der IPC nach 140 Minuten, beim Vergleich von IPC20 und IPC140, herabreguliert.

Sarkosindehydrogenase (SarDH) (DS8)

SarDH ist ein Enzym aus dem Glycinstoffwechsel. Es katalysiert die Demethylierung von Sarkosin zu Glycin. Außerdem ist es damit Bestandteil des Stoffwechsels von Betain, bei dem eine hepatoprotektive Funktion beschrieben ist (10,128). Sarkosindehydrogenase ist ein Enzym der mitochondrialen Matrix und 919 Aminosäuren lang. Es war beim Vergleich von IPC20 und SHAM20 in IPC20 hochreguliert.

4 Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, Proteine zu identifizieren, die bei der IPC der Leber und dem dadurch induzierten Schutz des Organes vor IR-Schäden differentiell exprimiert werden. Es wurde das Proteom des Zytosols im pH-Bereich 4-7 der Gewebeproben zu verschiedenen Zeitpunkten der Behandlung miteinander verglichen, um hoch- bzw. herabregulierte Proteine zu detektieren. Dies sollte dazu beitragen, die Mechanismen der hepatischen IPC zu ergründen, welche noch nicht vollständig erforscht sind.

Gegenstand der Untersuchung war das Proteom von Ratten-Lebergewebe, das einer induzierten warmen partiellen Ischämie und Reperfusion unterzogen wurde.

Es wurde ein globaler proteomanalytischer Ansatz aus 2-DE gekoppelt mit Massenspektrometrie gewählt. Aus der Versuchsreihe lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Es bestätigte sich, dass IPC die Leber vor IR-Schäden schützt.
- Die reproduzierbar gute Auftrennung komplexer Proteingemische ist grundlegend für eine Proteomanalyse. Die 2-DE wurde probenspezifisch optimiert.
- Eine subzelluläre Fraktionierung der Proben verringerte deren Komplexität und ermöglichte es, geringer abundante Proteine zu detektieren. Außerdem konnte das Protokoll zur Auftrennung spezifisch an die jeweilige Fraktion angepasst werden. Proteintranslokationen ließen sich in dieser Arbeit nicht verfolgen. Eine absolute Reinheit der Zellfraktionen wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht suggeriert.
- Es zeigten sich zwei regulierte *spots* bei IR an IPC Gewebe (IPC-IR/IPC140).
- Im Verlauf der IPC zeigten sich fünf differentiell exprimierte Proteine (IPC140/IPC20), wovon eines auch lediglich durch die Operation ohne IPC reguliert war (SHAM140/SHAM20).

- Ein Protein war sofort nach Beendigung des IPC Protokolls verglichen mit der Kontrollgruppe reguliert (IPC20/SHAM20).
- Es ließen sich keine regulierten Proteinspots durch IR im sauren pH-Bereich des Zytosols nachweisen (IR/SHAM140).

4.1 Studiendesign und Methodik, Limitationen

Bei der warmen partiellen Leberischämie mit Reperfusion bei der Ratte ist das Organ zur Ischämieinduktion *in situ* belassen und die Hepatozyten verbleiben im Zellverband mit anderen hepatischen Zellen wie Kupffer- oder Endothelzellen. Für einen globalen, komparativen proteomanalytischen Ansatz zur hepatischen IPC, die perspektivisch klinische Anwendung finden könnte (66), erscheint ein *in vivo* Modell sinnvoll. Bei der Zielsetzung, noch unbekannte in die hepatische IPC involvierte Proteine zu identifizieren, ist es aussagekräftiger, die Zellen während der Behandlung in ihrem physiologischen Umfeld zu belassen. Es gibt Hinweise, dass molekulare Signalwege der IPC oder von IR auf Zellinteraktion oder humoralen Transmittern basieren. Solche Kaskaden wären am isolierten Organ möglicherweise unterbrochen.

Die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse aus solch einer tierexperimentellen Studie auf die klinische Anwendung ist eingeschränkt. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen erforderlich.

Bisher existieren nur wenige Studien mit proteomanalytischem Ansatz zum Thema der hepatischen IPC und IR-Schaden (5,109–111,113). Während andere Proteomstudien zur hepatischen IPC lediglich drei Behandlungsgruppen betrachteten (109,113), ist eine große Stärke der vorliegenden Untersuchung, dass sechs Untersuchungsbedingungen berücksichtigt wurden. Xu *et al.* (109) und Oshima *et al.* (113) verglichen in ihren Studien eine IPC-IR-Gruppe mit einer IR-Gruppe und einer scheinoperierten Kontrollgruppe. Unsere Arbeitsgruppe berücksichtigte zusätzlich den zeitlichen Verlauf, indem eine zweite Kontrollgruppe, bei der die Probenentnahme unmittelbar nach Beendigung des IPC Stimulus nach 20 Minuten erfolgte, integriert wurde. Bei den scheinoperierten Kontrolltieren erfolgte die Organentnahme zum entsprechenden Zeitpunkt. So war es möglich, die durch Präkonditionierung unmittelbar bewirkten Veränderungen zu untersuchen (Vergleich

zwischen SHAM20 und IPC20). Außerdem wurden Proben von Tieren gewonnen, bei denen nur die Präkonditionierung stattfand, ohne dass sich ein IR-Schaden anschloss. Bei einer Gruppe wurden Proben nach 20 Minuten (IPC20) und bei einer weiteren nach 140 Minuten (IPC140) gewonnen. Das wiederum ermöglichte, Proteomveränderungen im zeitlichen Verlauf der IPC zu detektieren. Es zeigten sich beim Vergleich der Gruppen IPC20 mit IPC140 fünf regulierte Proteine.

Als proteomanalytisches Verfahren wurde ein globaler, komparativer Ansatz mittels 2-DE und MS gewählt. Dies trug dem Vorhaben Rechnung, bisher im Kontext der IPC unbekannte Proteine, die möglicherweise eine Rolle spielen, zu identifizieren. So ließen sich für den pH-Bereich 4-7 des Zytosols insgesamt acht differentiell exprimierte Proteinspots (vgl. Tabelle 20) detektieren, wovon vier eindeutig identifiziert werden konnten (vgl. Tabelle 21). In einem *spot* (DS2) wurden zwei Proteine identifiziert (PDIA6 und ENTPD5). Dies kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei DS2 um einen sehr kleinen *spot* handelte und es daher nicht möglich war, ihn ohne eine Kontamination mit einem Protein eines benachbarten *spots* auszuschneiden. Zudem sind das Molekulargewicht und der *pI* der beiden aus DS2 identifizierten Proteine fast identisch (vgl. Tabelle 21). Bei der Einordnung dieser beiden Proteine in den Kontext der IPC ist zu berücksichtigen, dass unklar ist, welches der beiden Proteine reguliert war, oder ob ggf. beide reguliert waren.

Die Aussage, die mit 2-DE erzielt wird, ist eine relative Quantifizierung. Das heißt, ein Vergleich zweier unterschiedlich behandelte Proben zeigt an, ob die Intensität des *spot* in Gel X gegenüber der anders behandelten Probe in Gel Y unverändert geblieben ist, zu- oder abgenommen hat. Eine Aussage über den Grund der Veränderung der *spot*-Intensität ist genauso wenig möglich, wie die Bestimmung der absoluten Quantität der Veränderung. Es wäre denkbar, dass das betreffende Protein vermehrt synthetisiert bzw. verstärkt abgebaut wird. Die Veränderung kann insbesondere zum frühen Untersuchungszeitpunkt auf posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen beruhen, die einen *pI-shift* bewirken (129), so dass das Protein sich horizontal verschiebt und nun einem anderen *spot* im Gel entspricht. Möglich wäre auch eine subzelluläre Translokation. Ein Protein kann beispielsweise vom Zytosol ins Mitochondrion migrieren, was eine Expressionsabnahme bzw. -zunahme im jeweiligen Zellkompartiment ergibt.

Phosphorylierungen wurden, wie auch Expressionsveränderungen im mitochondrialen Proteom im Rahmen der Gesamtstudie durch die Arbeitsgruppe untersucht. Da es das Ziel war, durch IPC regulierte Proteine zunächst zu detektieren und zu identifizieren, ist der 2-DE/MS Ansatz durchaus geeignet. Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der beobachteten Veränderungen der Expression und posttranslationalen Modifikationen ist Gegenstand von Folgestudien.

Eine mögliche Alternative zur Proteinauftrennung mit 2-DE wäre der Einsatz der weiterentwickelten Technik DIGE, bei der fluoreszenzmarkierte Proben aus unterschiedlichen Versuchsgruppen zusammen in einem Gel aufgetrennt und verglichen werden können. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Problematik der technischen Reproduzierbarkeit der Gele entfällt, da zwei Proben im selben Gel verglichen werden können. Jedoch ist die Anzahl der durchführbaren Vergleiche durch die verfügbaren teuren Fluoreszenzfarbstoffe limitiert. Bei einer breit angelegten Studie wie dieser mit sechs Untersuchungsgruppen mit jeweils sechs biologischen Replikaten erschien die DIGE Technik wenig praktikabel.

Unsere Arbeitsgruppe verwendete differentielle Zentrifugationsschritte, um eine subzelluläre Fraktionierung der Proben zu erreichen. Dies diente dem Zweck, die Proben in ihrer Komplexität zu verringern. Das Auftrennungsverfahren konnte so zudem dem jeweiligen Subproteom angepasst werden. Darüber hinaus konnten die Zellkompartimente wie Zytosol oder Mitochondrien gesondert untersucht werden, um eventuelle Proteinmigrationen zwischen den Organellen zu detektieren.

Es sind mehr als 6.000 Proteine im *Human Liver Proteom Project* beschrieben (106,107). Eine weitere Fraktionierung erscheint allein der Komplexität wegen geboten. Eine Untersuchung des Gesamtzelllysats hätte den Nachteil, dass weniger abundante Proteine nicht detektiert bzw. überlagert würden. Der Nachweis von etwa 780 *spots* im pH-Bereich 4-7 weist auf eine sensitive *spot*-Detektion hin. In anderen Studien wurden im pH-Bereich 3-10 durchschnittlich 800-1200 *spots* detektiert (5,109). Dies spricht für die Wahl engerer pH-Bereiche. Dennoch lassen sich wahrscheinlich nicht alle Proteine darstellen. Insbesondere im pH-Bereich um 4 bleibt die Auftrennung trotz Optimierung des 2-DE Protokolls teilweise ungenau.

Insgesamt acht regulierte Proteinspots in allen Untersuchungsgruppen sind weniger als erwartet. Es wurde allerdings in dieser Arbeit nur ein Ausschnitt des zytosolischen Proteoms betrachtet (pH-Bereich 4-7). Im basischen Bereich zeigten sich im Rahmen der Gesamtstudie weitere acht regulierte spots (Dissertationsprojekt von Dipl. Biol. T. Strahl). Es kann spekuliert werden, dass der Entnahmezeitpunkt 140 Minuten nach Beginn des Protokolls zu früh ist, um eine Neusynthese von Proteinen zu detektieren. Xu *et al.* entnahmen die Organe erst nach zwei Stunden Reperfusion und zeigten insgesamt 39 differentiell exprimierte Proteine im Rahmen von IPC und IR im pH-Bereich 3-10 des Zytosols (109). Oshima *et al.* führten die Organentnahme sogar erst 24 Stunden nach Beendigung des Protokolls durch (113). Wenn neu synthetisierte Proteine tatsächlich erst zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar werden, wäre das ein Hinweis darauf, dass die in dieser Arbeit regulierten Proteine aufgrund von posttranslationalen Modifikationen differentiell exprimiert waren. Ferner könnte das gewählte Signifikanzniveau ($p < 0,03$) ein Grund dafür sein, dass nicht mehr *spots* als signifikant reguliert gewertet wurden. Bei einem niedrigeren Signifikanzniveau von $< 0,05$ zeigten sich jedoch viele *spots* von der Software als signifikant reguliert gewertet, die Verunreinigungen und Artefakte aufwiesen. Aufgrund dessen wurde das höhere Signifikanzniveau gewählt.

Auffällig ist zudem, dass IR als stärkster Stimulus, beim Vergleich mit der Kontrollgruppe (IR/SHAM140) keine mit der gewählten Methodik nachweisbaren Proteomalterationen verursachte. Das ist bemerkenswert, da in anderen Studien deutliche Alterationen durch IR gezeigt wurden (109,113). Eine Erklärung könnte abermals sein, dass die auf Neusynthese beruhenden Expressionsveränderungen mehr Zeit benötigen und 60 Minuten Reperusionszeit nicht ausreichend sind, um die Veränderungen zu detektieren. Einige in anderen Studien differentiell exprimierte Proteine liegen nicht im untersuchten pH-Bereich oder hatten eine andere subzelluläre Lokalisation, was eine weitere Erklärung sein könnte (109,113). Die meisten Expressionsveränderungen wurden im Verlauf der IPC detektiert (IPC140/IPC20). Es wäre interessant, in einer Folgestudie nach längerer Reperusionszeit bzw. zu einem späteren Organentnahmezeitpunkt Expressionsveränderungen zu evaluieren.

Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden sollte, ist die Reinheit der Zytosolfraktion, die exemplarisch nur einmal und nicht nach jeder subzellulären Fraktionierung mittels

Western Blot überprüft wurde. Da mitochondriale Proteine, wie etwa SarDH, in der zytosolischen Fraktion reguliert waren, deutet dies darauf hin, dass das verwendete Fraktionierungsprotokoll nur zu einer unvollständigen Reinheit der einzelnen Zellfraktionen führte. In der durchgeführten Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen fraktionsspezifische Proteine anderer Zellkompartimente waren diese in der Zytosolfraktion nicht nachweisbar. Dass trotzdem Proteine, die typischerweise nicht im Zytosol lokalisiert sind, detektiert wurden, kann als Hinweis gewertet werden, dass im Rahmen von IPC Proteinmigration stattfindet. Es könnte sein, dass mitochondriale Proteine in Ribosomen im Zytosol synthetisiert werden und zu ihrem Zielort migrieren. Des Weiteren ist nicht ausgeschlossen, dass mitochondriale Proteine auch im Zytosol oder anderen Zellfraktionen vorkommen. HSP 60 beispielsweise wurde zunächst für ein ausschließlich mitochondrial lokalisiertes Protein gehalten. Mittlerweile wurde auch ein Vorkommen im Zytosol beschrieben (130).

Wenn man das ER als im weiteren Sinne dem Zytosol zugehörig definiert, haben zwei von acht der in dieser Arbeit identifizierten Proteine ihre primäre Lokalisation nicht im Zytosol. Das deutet, auch unter Berücksichtigung der oben genannten möglichen Gründe darauf hin, dass eine strikte Auftrennung in die einzelnen Zellkompartimente mit dem hier verwendeten Fraktionierungsprotokoll nicht erreicht wurde. Bekannterweise ist eine komplette Reinheit der Proteinfractionen schwierig zu erreichen (104,131). Neuere fluoreszenzbasierte Methoden (z.B. *fluorescence-assisted-organelle-sorting*) könnten künftig ergänzend eingesetzt werden (132).

Voraussetzung für eine aussagekräftige und valide komparative Proteomanalyse war die Etablierung eines 2-DE Protokolls, das eine reproduzierbare Proteinauftrennung im untersuchten pH-Bereich ermöglichte.

Hierzu wurden etablierte Verfahren (100–102,104,115,116) angepasst und modifiziert, um eine adäquate Separierung der Proteine nach pI und Molekulargewicht zu erreichen.

Es lässt sich nach der Anfertigung von insgesamt 108 2D-Gelen mit Proteinproben aus sechs verschiedenen Untersuchungsgruppen (je $n=6$) und drei technischen Replikaten je Leberprobe sagen, dass sich, trotz Optimierung der 2-DE, eine gewisse technische Varianz bei den Gelen nicht eliminieren ließ.

Für die Auswertung der 2D-Gele ist es unerlässlich, die beeinflussbare technische Varianz zu minimieren. Die Methodik wurde daher probenspezifisch optimiert, so dass durch eine gute Reproduzierbarkeit der Gele eine adäquate Analyse möglich war.

4.2 Einordnung der differentiellen Proteine in den Kontext der ischämischen Präkonditionierung

Bei den durchgeführten Gruppenvergleichen zeigten sich insgesamt acht Proteinspots reguliert. Fünf *spots* waren im zeitlichen Verlauf der IPC reguliert (IPC140/IPC20), zwei bei IR-Schaden an IPC Gewebe verglichen mit IPC Gewebe (IPC-IR/IPC140). Ein *spot* zeigte sich sowohl im Verlauf der IPC (IPC140/IPC20) als auch im Rahmen der Liegezeit bei den scheinoperierten Tieren reguliert (SHAM140/SHAM20). Ein weiterer *spot* war unmittelbar nach IPC differentiell exprimiert (IPC20/SHAM20). Von diesen differentiell exprimierten Proteinen konnten vier eindeutig massenspektrometrisch identifiziert werden. Bei zweien konnte der Subtyp nicht eindeutig identifiziert werden. In einem *spot* wurden zwei Proteine identifiziert.

Zwei der differentiell exprimierten Proteine, α -Tubulin (DS1) sowie Aktin (DS4), sind Bestandteil des Zytoskeletts.

α -Tubulin war nach IR mit vorgeschalteter IPC (Vergleich IPC140/IPC-IR) um ca. 25% weniger stark exprimiert verglichen mit IPC140. Gemeinsam mit β -Tubulin konstituiert es die Mikrotubuli des Zytoskeletts. In einem GTP-abhängigen Prozess de- und repolymerisieren diese Heterodimere im Rahmen verschiedener zellulärer Prozesse, wie Mitose oder intrazellulärem Transport (133,134). Interessanterweise fand diese Herabregulierung nur bei IR an präkonditioniertem Gewebe statt und nicht bei IR-Schaden ohne vorherige Präkonditionierung (IR/SHAM140). Die Aussagekraft dieser beobachteten Regulierung muss allerdings kritisch gesehen werden, da die Regulierung von *spot* DS1 nur in zwei von drei technischen Replikatreihen den statistischen Kriterien ($p < 0,03$) entsprach. Außerdem ließ sich der genaue Subtyp des α -Tubulins nicht eindeutig bestimmen.

Aktin (DS4) wurde im Verlauf der IPC (IPC140/IPC20) signifikant ($p < 0,01$) herabreguliert. Nach 140 Minuten hatte der *spot* DS4 85% der Intensität, die er nach

20 Minuten hatte, verloren. In der MS-Analyse ließ sich der Subtyp (G-Aktin, F-Aktin) nicht bestimmen. Da das im Gel abgeschätzte Molekulargewicht von ca. 40 kDa G-Aktin (42 kDa) entspricht, handelt es sich wahrscheinlich um die monomerische Form. Die polymerisierte Form F-Aktin hätte ein höheres Molekulargewicht. Das unter Hydrolyse von ATP mikrofilamentbildende Strukturprotein Aktin ist in diverse zelluläre Funktionen involviert, wie Ionenkanalaktivität, Migration, Sekretion oder auch Zellproliferation und Apoptose (133,135). Es unterliegt einer ständigen Re- und Depolymerisierung und geht zahlreiche Interaktionen mit *actin-binding-proteins* ein (135). Alterationen im Zytoskelett wurden im Rahmen von IR und IPC bereits beschrieben (136–139). Nakamura *et al.* konnten am Herzen zeigen, dass die Inhibierung der Depolymerisierung der Mikrotubuli durch Colchizin oder Nocodazol, den protektiven Effekt der IPC zunichte macht (137). Das legt eine wichtige Funktion der Mikrotubuli zumindest bei der kardialen IPC nahe und lässt vermuten, dass die Depolymerisation der Mikrotubuli essentiell für den Wirkmechanismus der IPC ist. Möglicherweise führt IPC dazu, dass die Depolymerisierung der Mikrotubuli bei IR vereinfacht wird.

Ein Verlust an polymerisiertem F-Aktin korreliert mit Zellschaden und Integritätsverlust nach IR (140). Keller und Mitarbeiter zeigten, dass bei der Präkonditionierung der Leber mit atrialem-natriuretischem-Peptid (ANP) das F-Aktin des Zytoskeletts nach IR, bei verringertem G-Aktin und gleich bleibendem Gesamtaktin, deutlich hochreguliert war (136). Bei Applikation eines p38 MAPK-Inhibitors ließen sich diese Veränderungen nicht beobachten. Das lässt vermuten, dass den Zytoskelettalterationen eine Aktivierung der p38 MAPK zugrunde liegt.

Die Herabregulierung des Proteinproduktes des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens Aktin im Verlauf der IPC im Rahmen dieser Studie könnte Ausdruck eines Polymerisierungsvorganges sein. Es wäre denkbar, dass G-Aktin sich zugunsten von polymerisiertem F-Aktin verringert. Es stünden dadurch im Rahmen von IR-Ereignissen höhere F-Aktin Level zur Verfügung. Das würde bedeuten, dass IPC in Korrelation mit den Ergebnissen von Keller *et al.* und der ANP-Präkonditionierung das Zytoskelett stabilisiert. Es ist jedoch auch ein *pl-shift* im Rahmen der Phosphorylierung des Aktin-Zyklus denkbar. Hier sollten in weiteren Studien G- und F-Aktin im Rahmen von IPC und IR quantifiziert werden. Zudem wäre es interessant, auch die am Aktin-Zyklus beteiligten Mediatoren Profilin, Thymosin β 4 oder Cofilin in diesem Zusammenhang zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Alterationen im Zytoskelett eine Rolle bei der IPC spielen. Ob sie zum protektiven Effekt der IPC beitragen oder nur Begleiterscheinungen infolge der Präkonditionierung sind, muss zukünftig weiter untersucht werden.

Nach IR zeigte sich an präkonditioniertem Lebergewebe (IPC-IR) ein weiterer regulierter Proteinspot (DS2) beim Vergleich mit alleiniger Präkonditionierung (IPC140). Bei IPC-IR war der *spot* 2,3-fach hochreguliert. Aus DS2 wurden zwei Proteine identifiziert. Daher lässt sich nicht eindeutig festlegen, welches der beiden Proteine hochreguliert war oder ob ggf. beide vermehrt exprimiert werden. Sowohl die ENTPD5 als auch die PDIA6 lassen sich in den Kontext der IPC einordnen.

PDIA6 ist wie die anderen Mitglieder der Protein Disulfid Isomerase Familie eine Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase im ER und fungiert als Chaperon. Neben den Hauptfunktionen der oxidativen Proteinfaltung bzw. Katalyse von Disulfidbrückenformation und Verhinderung der Aggregation fehlerhaft gefalteter Proteine (*misfolding*) wurden viele weitere Funktionen wie Calciumhomöostase, Transport und Antigenpräsentation für Proteine der PDI Familie beschrieben (120). Im Zusammenhang mit IPC und IR wurden PDI Enzyme bereits an verschiedenen Organen beschrieben (109,113,139,141).

Das zweite Protein, das im *spot* DS2 identifiziert wurde, war ENTPD5. Ektonukleotidasen sind Enzyme, die extrazelluläre bzw. in Organellen vorhandene Nukleotide zu den analogen Nucleosiden metabolisieren und auf der Zellmembran sowie im ER lokalisiert sind. ENTPD5 hydrolysiert Purin-Nucleosiddiphosphate (UDP und GDP) zu den entsprechenden Monophosphaten und Phosphat. ENTPD5 induziert durch UDP Hydrolyse im ER die N-Glykosylierung von Proteinen und assistiert bei deren Faltung. ENTPD5-depletierte Mäuse zeigten eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen in Hepatozyten (122). Außerdem spielt ENTPD5 eine Rolle in einem ATP-Hydrolyse-Zyklus, der zum erhöhten Verbrauch von ATP im Zytosol führt und kompensatorisch zu einer Steigerung der aeroben Glykolyse (121). Im Zusammenhang mit hepatischer IPC wurde ENTPD5 jedoch bisher nicht beschrieben. Wolff *et al.* zeigten bei der kardialen IPC, dass eine genetische Inaktivierung von Ekto-5'-Nucleotidase keine Auswirkung auf den protektiven Effekt von IPC am Herzen hat (142).

Da sich anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig zuordnen lässt, welches der beiden Proteine reguliert war, ist jegliche Kontexteinordnung sehr spekulativ. Zukünftige Studien könnten darauf hinzielen, die Expressionsveränderungen der beiden Proteine im Rahmen von IPC näher zu charakterisieren.

Eines von fünf Proteinen, die im Verlauf der IPC (IPC140/IPC20) reguliert waren, war Protein SEC 13 homolog (DS3). Der *spot* DS3 ist einer von vier differentiell regulierten Proteinspots aus diesem Vergleich, die nach 140 Minuten herabreguliert waren. SEC 13 ist ein Protein des ER und des NPC. Am NPC, großen Proteinkomplexen, welche die Kernhülle durchziehen und dem Austausch zwischen Nukleus und Zytosol dienen, ist die genaue Funktion von SEC 13 nicht bekannt. Am ER ist SEC 13 eines von fünf Proteinen, die den COPII konstituieren (123). Es bildet zusammen mit SEC 31 die äußere Hülle des COPII Transportvesikels. COPII transportiert Proteine oder andere Moleküle vom rauen ER anterograd in andere Zellkompartimente und in Richtung Golgi-Apparat (143). Die Intensität des *spot* DS3 nahm im Verlauf der Präkonditionierung im Zytosol um über 40% ab. Dies könnte bedeuten, dass SEC 13 eine Rolle beim Transport von Signalmolekülen spielt, die nach dem Präkonditionierungsstimulus vermehrt synthetisiert und vom ER wegtransportiert werden. Weitere Gründe für die Intensitätsabnahme könnten ein horizontaler *shift* aufgrund von posttranslationalen Modifikationen sein oder ein Wechsel der subzellulären Lokalisation im Rahmen der Transportfunktion. Beim Vergleich der Kontrollgruppen (SHAM140/SHAM20) war keine signifikante Verringerung des *spots* DS3 zu beobachten, sodass die Liegezeit während der Operation als Grund für die Abnahme der Intensität ausgeschlossen werden kann. Das bedeutet, dass die Veränderungen wahrscheinlich durch die IPC induziert wurden. Bisher wurde SEC 13 noch nicht im Kontext der IPC in der Literatur beschrieben.

Neben Protein SEC 13 homolog und Aktin (DS3 und DS4) waren noch drei weitere *spots* beim Vergleich zwischen IPC 20 und IPC 140 differentiell exprimiert.

HSP 60 (DS5) war in zwei von drei Replikatreihen nach 140 Minuten hochreguliert. DS6 konnte als PDCD6IP identifiziert werden und war 140 Minuten nach der IPC deutlich herabreguliert. Ein weiterer *spot* (DS7) war beim Vergleich IPC140/IPC20 signifikant herabreguliert, ließ sich aber nicht massenspektrometrisch identifizieren.

PDCD6IP ist ein ESCRT Komplex assoziiertes Protein. ESCRT Komplexe assistieren bei der Sortierung ubiquitiniertes Proteine in intraluminale Vesikel von multivesikulären Endosomen, damit diese im Lysosom degradiert werden können (125). Außerdem spielt der ESCRT Signalweg eine Rolle bei der Zytokinese. Darüber hinaus wurde eine antiapoptotische Wirkung von PDCD6IP durch calciumabhängige Interaktion mit *Apoptosis Linked Gen 2* (ALG-2) beschrieben. Eine Überexpression von PDCD6IP soll demnach vor Apoptose schützen (127). Neuere Studien beschreiben PDCD6IP jedoch als unverzichtbaren Mediator bei der Calcium-induzierten Aktivierung von Caspase 9 und damit als *Promoter* von Apoptose bei ER-Stress (144). Diese neueren Erkenntnisse sind konträr zu der Annahme, dass eine Überexpression von PDCD6IP Apoptose inhibiert (127).

Im Kontext der IPC wurde PDCD6IP bisher nicht beschrieben. Da PDCD6IP im Verlauf der Präkonditionierung deutlich herabreguliert war, kann spekuliert werden, dass das Protein posttranslational modifiziert wird und dadurch seinen pI verändert. Dies könnte im Zuge seiner Funktion im ESCRT-Signalweg geschehen. Dagegen spricht, dass das Protein in dieser Studie aus keinem anderen regulierten *spot* identifiziert wurde. Denn mit verändertem pI müsste es theoretisch an anderer Stelle wieder auftauchen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass PDCD6IP stark vermindert exprimiert wird, damit die durch ER-Stress (19) und durch zytosolischen Calcium-Anstieg vermittelte Caspase 9-Aktivität gehemmt wird. Das würde letztlich das Gewebe vor Apoptose schützen und stellt möglicherweise eine Erklärung für niedrigere Apoptoseraten bei IPC Gewebe dar, das IR erfährt.

Ob PDCD6IP durch Verringerung von Apoptoseraten oder Degradierung ubiquitiniertes Proteine im Rahmen von IPC eine bedeutende Rolle spielt, könnte beispielsweise durch *knockout* des kodierenden Gens weiter untersucht werden. Zudem kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Translokation des Proteins in eines der nicht untersuchten Zellkompartimente kam. Auch diesbezüglich sind weitere Untersuchungen nötig.

HSP 60 hat, wie andere Proteine der Chaperonin Familie, unter anderem die Funktion, unter Stressbedingungen die Integrität von Peptiden und Proteinen zu wahren, indem es bei der korrekten Faltung assistiert und präventiv *misfolding* verhindert. HSP 60 wird beispielsweise bei Hyperglykämie sowie oxidativem Stress hochreguliert (124). Es wurde zunächst als rein mitochondriales Protein betrachtet.

Später belegten Studien belegen, dass HSP 60 sowohl in Mitochondrien als auch im Zytosol vorkommt und unter Stressbedingungen zwischen den Kompartimenten verschoben werden kann (130). Im Mitochondrion spielt HSP 60 neben seiner Chaperonfunktion auch beim Transport von Proteinen und Peptiden entlang der mitochondrialen Membran eine Rolle. Im Zytoplasma wird HSP 60 als wichtiger Regulator von Apoptose betrachtet und kann durch Interaktion mit verschiedenen Mediatoren apoptotischer Signalwege präventiv wirken (130).

Penna *et al.* interpretierten höhere mitochondriale HSP 60-Level bei ischämisch postkonditionierten Rattenherzen im Vergleich mit der IR-Gruppe als Zeichen für einen mitochondrial-protektiven Effekt der Postkonditionierung (145,146). Im Umkehrschluss werteten sie erhöhte HSP 60 Level im Zytosol bei der IR-Gruppe als Marker für mitochondrialen Stress. Andere Studien berichten hingegen eine Verschiebung von HSP 60 aus dem Zytosol ins Mitochondrion unter Stressbedingungen (130). In dieser Studie ergaben sich Hinweise auf eine HSP 60 Hochregulierung im Verlauf der Präkonditionierung (IPC140/IPC20). Noch stärker und in allen technischen Replikatreihen signifikant hochreguliert (in Übereinstimmung mit Übersichtsgelen des pH-Bereichs 3-10 aus dem Dissertationsprojekt von F. Stelzner) war HSP 60 jedoch in der scheinoperierten Kontrollgruppe (SHAM140/SHAM20), was darauf hinweist, dass allein die Belastung des invasiven Eingriffs eine Hochregulierung im Zytosol bewirkt. Umso erstaunlicher ist, dass IR keine signifikante Regulierung von HSP 60 bewirkte. Es kann spekuliert werden, dass der operative Eingriff, dem auch die IR-Tiere ausgesetzt waren, eine Hochregulierung verursachte. IR könnte gleichzeitig einen *shift* von HSP 60 ins Mitochondrion bewirken, so dass im Zytosol letztlich keine Veränderung detektiert wird. Allerdings zeigte sich im Dissertationsprojekt von Dipl. Biol. T. Strahl HSP 60 in der mitochondrialen Fraktion nicht reguliert.

Tiriveedhi *et al.* untersuchten die stärkere Belastung von steatotischen Lebern durch IR im Vergleich zu integren Organen mit einem 2-DE proteomanalytischen Ansatz (139). Sie beobachteten unter anderem weit niedrigere Expressionslevel von HSP 60 und anderen Chaperonen im Leberproteom von steatotischen Organen. Das weist auf eine wichtige Rolle von HSP 60 bei der Reaktion auf ER-Stress sowie auf den vermehrten Anfall von fehlgefalteten Proteinen und der Verhinderung der UPR hin. Im Umkehrschluss lässt sich sagen, dass die Organe ohne Integritätsdefizit mit höheren HSP 60 Konzentrationen besser vor IR geschützt waren.

Unsere und eine Reihe weiterer Studien (124,130,141,145) zeigen eine große Bedeutung von HSP 60 bei der Reaktion auf Stress und Noxen. Ob sich die Chaperonaktivität durch IPC oder andere Verfahren tatsächlich induzieren und protektiv nutzen lässt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden und erfordert weitere Studien.

Der einzige Proteinspot (DS8), der unmittelbar nach Abschluss der IPC im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert war (IPC20/SHAM20) konnte als SarDH identifiziert werden. Dieses um das 2,4-fache verstärkt exprimierte Enzym der mitochondrialen Matrix katalysiert die chemische Reaktion bei welcher Sarkosin (*N*-Methylglycin) zu Glycin demethyliert wird.

Im Zusammenhang mit der IPC wurde dieses Enzym bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch beschrieben, dass SarDH bei chronischer Aktivierung von PPAR- α in Mäuselebern herabreguliert wird (147). Dies geschieht im Zuge einer generellen Hochregulierung von Enzymen des Fettsäurestoffwechsels und einer Herabregulierung von Enzymen aus dem Protein- und Kohlehydratmetabolismus bei Aktivierung von PPAR- α . Bei IR-Schaden wiederum ist eine verstärkte Aktivierung dieses Rezeptors ebenso bekannt (148) wie bei der IPC von verschiedenen Geweben (149). Es wird vermutet, dass PPAR- α den Energiemetabolismus unter ischämischen Bedingungen effizienter macht und somit protektiv wirkt. Ob PPAR- α Aktivierung jedoch tatsächlich gewebsschützend wirkt, bleibt strittig (149). Wenn man davon ausgeht, dass IPC tatsächlich eine vermehrte Aktivierung von PPAR- α bewirkt, wäre die in dieser Studie beobachtete Hochregulierung konträr zu den Erkenntnissen von Chu *et al.* (147), die eine Herabregulierung von SardDH bei Stimulation dieses Rezeptors beschreiben. Jedoch waren die Versuchstiere in jener Studie einer Daueraktivierung von PPAR- α ausgesetzt. Somit stellt sich die Frage der Vergleichbarkeit, da in dieser Arbeit davon auszugehen ist, dass der Stimulus nur kurzfristig, während der Ischämie erfolgte. Ob SarDH zwecks einer günstigeren Energieverwertung bei IPC reguliert wird, ist spekulativ.

Die verstärkte Expression von SarDH und die dadurch zu erwartende gesteigerte Degradierung von Sarkosin zu Glycin könnte auch als Vorbereitung der Zelle auf oxidativen Stress interpretiert werden. Glycin ist eine von drei Aminosäuren aus denen das antioxidative Glutathion synthetisiert wird.

Darüber hinaus reagieren Hepatozyten sowie Kupffer- und Endothelzellen mit Anschwellen (*cell swelling*) auf IR-Schaden (9). Dem osmotisch wirksamen Betain (*N,N,N*-Trimethylglycin) wird eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des hepatozellulären Hydratationsstatus zugeschrieben. Hoffmann und Mitarbeiter (10) zeigten, dass die Genexpression von in den Betainmetabolismus involvierten Enzymen (Betain-Homozystein-Methyltransferase, Dimethylglycindehydrogenase, SarDH) signifikant mit dem Hydratationszustand der Zelle korreliert. Die Expression dieser Enzyme war bei Zellschrumpfung herabreguliert, während sie durch Volumenzunahme der Zelle stark induziert wurde. Infolgedessen wird osmotisch wirksames Betain im Zytosol vermutlich schneller degradiert und dem Anschwellen der Zelle dadurch entgegengewirkt. Es wäre vorstellbar, dass hepatische IPC eine Hochregulierung von SarDH bewirkt, um einem exzessiven Anschwellen der Zelle infolge eines drohenden IR-Schadens präventiv durch Betaindegradierung entgegenzuwirken. Diese Regulierung erfolgte zudem sehr schnell. Dass SarDH beim Vergleich zwischen SHAM20 und IPC20 über 2,4-fach hochreguliert wurde impliziert, dass die Expressionsalteration in einem kurzen Zeitfenster stattfand oder dass es sich um eine interaktions-, translokations- oder modifikationsbedingte Hochregulierung handelt.

Die funktionelle Bedeutung für den Energiemetabolismus von SarDH im Rahmen von IPC könnte zukünftig unter pharmakologischer Blockade oder Aktivierung von PPAR- α weiter ergründet werden. Bezüglich der Hypothese, dass SarDH bei IPC verstärkt exprimiert wird, um einem Anschwellen der Zelle durch Betaindegradierung entgegen zu wirken, wäre es sinnvoll, Betain-Konzentrationen der hepatischen Zellen bei IPC und IR gezielt zu untersuchen. Zudem sind in diesem Zusammenhang auch die anderen Enzyme des Betainmetabolismus (Betain-Homozystein-Methyltransferase und Dimethylglycindehydrogenase) von Interesse. Es ließe sich beispielsweise untersuchen, ob eine pharmakologische Blockade eines dieser Enzyme IR-Schaden verstärken bzw. den protektiven Effekt von IPC mindern würde.

4.3 Konklusion und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen in Übereinstimmung mit vielen anderen Studien, dass IPC die Leber vor IR-Schaden schützt. Es fanden sich acht Proteinspots unterschiedlicher Kategorien, die im Rahmen von IPC und IR Alterationen erfahren. Es zeigten sich Veränderungen im Zytoskelett (Aktin und α -Tubulin), bei Proteinen mit Chaperon Funktion (HSP 60, PDIA6), bei Proteinen aus dem Zelltransport (Protein SEC 13 homolog, PDCD6IP) sowie bei Enzymen aus dem Aminosäuren- (SarDH) und Energiemetabolismus (ENTPD5). Manche dieser Proteine wurden bereits im Kontext der Präkonditionierung beschrieben (Zytoskelett, Chaperone), während andere erstmals in diesem Zusammenhang detektiert wurden (SarDH, PDCD6IP, SEC 13). Die Veränderungen in der Expression ereigneten sich größtenteils im Verlauf der Präkonditionierung (Aktin, HSP 60, PDCD6IP, Protein SEC 13) beim Vergleich von Organen, die unmittelbar nach Beendigung des Präkonditionierungsprotokolls entnommen wurden, mit IPC-Organen nach 140 Minuten. Es gab aber auch Veränderungen, die schneller induziert wurden (SarDH) beim Vergleich der Kontrollgruppe nach 20 Minuten mit IPC-Gewebe unmittelbar nach Abschluss der Präkonditionierung. Das verdeutlicht, dass manche Proteinregulierungen bei der IPC im Minutenbereich stattfinden, während andere längere Zeit brauchen, bis die Proteomalterationen messbar werden. Zukünftige Studien könnten eine längere Periode zwischen Abschluss des Behandlungsprotokolls und Organentnahme implementieren, um Proteomveränderungen zu detektieren, die ggf. eine längere Zeit benötigen, bis sie messbar werden.

Mit dem 2-DE/MS Ansatz lassen sich Proteomveränderungen bei der IPC detektieren und involvierte Proteine identifizieren. Damit wird die Grundlage für nötige Anschlussstudien geschaffen. Die Aussage, die der 2-DE Ansatz erlaubt, ist deskriptiv. Eindeutige Schlüsse über die Gründe für die durch IPC veränderten Proteinexpressionen sind nicht möglich. Als mögliche Ursachen kommen Degradierung, gesteigerte Synthese, Modifikation oder Translokation von Proteinen in Frage. Ebenso lässt sich nicht genau feststellen, im Rahmen welches Signalweges das Protein reguliert wurde. Es bleibt zu klären, ob den in dieser Studie detektierten Proteinen eine Schlüsselrolle zukommt oder ob sie eher eine Randerscheinung der IPC Mechanismen sind.

Diesen Fragestellungen sollte in Folgestudien nachgegangen werden. Diese könnten Versuchsreihen mit pharmakologischer Blockade/Aktivierung der hier identifizierten Proteine beinhalten, um deren Bedeutung für den Gesamtmechanismus der IPC zu eruieren.

Sollte eines der Proteine eine Schlüsselrolle bei protektiven Signalwegen einnehmen wäre ferner zu klären, ob der Effekt pharmakologisch nutzbar gemacht werden kann. Letztlich bleiben die Fragen nach der klinischen Anwendbarkeit, der Praktikabilität und pharmakologischen Beeinflussbarkeit der entdeckten potentiellen Mediatoren der Präkonditionierung zu klären.

5 Literatur

1. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, u. a. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery*. März 1992;111(3):251–9.
2. Seraffín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Peralta C. Ischemic Preconditioning Increases the Tolerance of Fatty Liver to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat. *Am J Pathol*. August 2002;161(2):587–601.
3. Busuttil RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. Juli 2003;9(7):651–63.
4. Jimenez-Castro MB, Elias-Miro M, Casillas-Ramirez A, Peralta C. Experimental Models in Liver Surgery. In: Abdeldayem H, Herausgeber. *Hepatic Surgery* [Internet]. InTech; 2013, doi:10.5772/51829
5. Vascotto C, Cesaratto L, D'Ambrosio C, Scaloni A, Avellini C, Paron I, u. a. Proteomic analysis of liver tissues subjected to early ischemia/reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *PROTEOMICS*. Juni 2006;6(11):3455–65.
6. Gracia-Sancho J, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Molecular pathways in protecting the liver from ischaemia/reperfusion injury: a 2015 update. *Clin Sci Lond Engl 1979*. August 2015;129(4):345–62.
7. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology Baltim Md*. August 1992;16(2):454–61.
8. Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. Februar 2007;27(1):6–16.
9. Franchello A, Gilbo N, David E, Ricchiuti A, Romagnoli R, Cerutti E, u. a. Ischemic preconditioning (IP) of the liver as a safe and protective technique against ischemia/reperfusion injury (IRI). *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. Juli 2009;9(7):1629–39.
10. Hoffmann L, Brauers G, Gehrmann T, Häussinger D, Mayatepek E, Schliess F, u. a. Osmotic regulation of hepatic betaine metabolism. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 5. Januar 2013;304(9):G835–46.
11. Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med*. 15. Juli 2002;33(2):210–9.

12. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Januar 2003;284(1):G15-26.
13. González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest*. Februar 1993;91(2):456–64.
14. Kim HJ, Joe Y, Kong JS, Jeong S-O, Cho GJ, Ryter SW, u. a. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via ROS-dependent Akt signaling and inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:306421.
15. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock Augusta Ga*. August 1997;8(2):80–5.
16. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1998;5(4):402–8.
17. Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, Jimenez-Castro M, Peralta C. Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? *Liver Transpl*. 2011;17(9):993–1004.
18. Mosbah IB, Alfany-Fernandez I, Martel C, Zaouali MA, Bintanel-Morcillo M, Rimola A, u. a. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death Dis*. Juli 2010;1(7):e52.
19. Tang W-X, Wang L-K, Wang Y-Q, Zong Z-J, Gao Z-X, Liu X-S, u. a. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation protects against endoplasmic reticulum stress-induced HepG2 cell apoptosis. *Mol Cell Biochem*. Januar 2014;385(1–2):179–90.
20. Nace GW, Huang H, Klune JR, Eid RE, Rosborough BR, Korff S, u. a. Cellular-specific role of toll-like receptor 4 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology Baltim Md*. Juli 2013;58(1):374–87.
21. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 11. Dezember 2012;10(2):79–89.
22. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent

pathway. *Hepatology* Baltim Md. November 1999;30(5):1223–31.

23. Hu G-H, Lu X-S. Effect of normothermic liver ischemic preconditioning on the expression of apoptosis-regulating genes C-jun and Bcl-XL in rats. *World J Gastroenterol WJG*. 7. Mai 2005;11(17):2579–82.

24. Gomez D, Homer-Vanniasinkam S, Graham AM, Prasad KR. Role of ischaemic preconditioning in liver regeneration following major liver resection and transplantation. *World J Gastroenterol WJG*. 7. Februar 2007;13(5):657–70.

25. Lloris-Carsí JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc*. Dezember 1993;25(6):3303–4.

26. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1. November 1986;74(5):1124–36.

27. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol*. Oktober 1992;263(4 Pt 2):H1107-1112.

28. Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol*. Oktober 1998;275(4 Pt 2):H1375-1387.

29. Cribier A, Korsatz L, Koning R, Rath P, Gamra H, Stix G, u. a. Improved myocardial ischemic response and enhanced collateral circulation with long repetitive coronary occlusion during angioplasty: a prospective study. *J Am Coll Cardiol*. September 1992;20(3):578–86.

30. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW Jr, Herrmann HC, Laskey WK. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation*. Dezember 1990;82(6):2044–51.

31. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology*. November 1997;87(5):1182–90.

32. Frässdorf J, Huhn R, Niersmann C, Weber NC, Schlack W, Preckel B, u. a. Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels. *Can J Anaesth J Can Anesth*. August 2010;57(8):767–73.

33. Cheung MMH, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, u. a. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on

children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol.* 6. Juni 2006;47(11):2277–82.

34. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res.* 1. August 2008;79(3):377–86.

35. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg.* Oktober 1992;107(4):549–52.

36. Salido EM, Dorfman D, Bordone M, Chianelli MS, Sarmiento MIK, Aranda M, u. a. Ischemic conditioning protects the rat retina in an experimental model of early type 2 diabetes. *Exp Neurol.* Februar 2013;240:1–8.

37. Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail.* Januar 1997;19(1):47–60.

38. Yellon DM, Baxter GF. A „second window of protection“ or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol.* April 1995;27(4):1023–34.

39. Schulz R, Post H, Vahlhaus C, Heusch G. Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation.* 8. September 1998;98(10):1022–9.

40. Eisen A. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis.* Februar 2004;172(2):201–10.

41. Kuzmin AI, Gourine AV, Molosh AI, Lakomkin VL, Vassort G. Effects of preconditioning on myocardial interstitial levels of ATP and its catabolites during regional ischemia and reperfusion in the rat. *Basic Res Cardiol.* April 2000;95(2):127–36.

42. Mei DA, Nithipatikom K, Lasley RD, Gross GJ. Myocardial preconditioning produced by ischemia, hypoxia, and a KATP channel opener: effects on interstitial adenosine in dogs. *J Mol Cell Cardiol.* Juni 1998;30(6):1225–36.

43. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol.* Mai 1995;268(5 Pt 2):H2157-2161.

44. Chen W, Glasgow W, Murphy E, Steenbergen C. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart. *Am J Physiol.* Juni 1999;276(6 Pt 2):H2094-2101.

45. Lochner A, Marais E, Du Toit E, Moolman J. Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* Mai 2002;962:402–14.
46. Strijdom H, Genade S, Lochner A. Nitric Oxide synthase (NOS) does not contribute to simulated ischaemic preconditioning in an isolated rat cardiomyocyte model. *Cardiovasc Drugs Ther Spons Int Soc Cardiovasc Pharmacother.* März 2004;18(2):99–112.
47. Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Meng X, Banerjee A, Harken AH. Clinical L-type Ca(2+) channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Dezember 1999;31(12):2191–7.
48. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Januar 1997;29(1):207–16.
49. Grover GJ, Sleph PG, Dzwonczyk S. Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and their possible interaction with adenosine A1-receptors. *Circulation.* Oktober 1992;86(4):1310–6.
50. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* Juli 1991;84(1):350–6.
51. Rizvi A, Tang XL, Qiu Y, Xuan YT, Takano H, Jadoon AK, u. a. Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol.* September 1999;277(3 Pt 2):H874-884.
52. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart Br Card Soc.* April 1997;77(4):314–8.
53. Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bøttcher M, Kalltoft AK, Terkelsen CJ, u. a. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet.* 27. Februar 2010;375(9716):727–34.
54. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, u. a. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med.* 8. Oktober 2015;373(15):1397–407.
55. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, u. a. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med.* 8. Oktober 2015;373(15):1408–17.

56. Theodoraki K, Tympa A, Karmanioliou I, Tsaroucha A, Arkadopoulos N, Smyrniotis V. Ischemia/reperfusion injury in liver resection: A review of preconditioning methods. *Surg Today*. 1. Mai 2011;41(5):620–9.
57. Lai I-R, Chang K-J, Chen C-F, Tsai H-W. Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: the protective role of heme oxygenase-1. *Transplantation*. 15. Mai 2006;81(9):1311–7.
58. Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J, u. a. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology*. Februar 2000;31(2):407–15.
59. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg*. Oktober 1908;48(4):541–9.
60. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebah M, Ichai P, u. a. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg*. Februar 2006;202(2):203–11.
61. Makuuchi M, Mori T, Guvén P, Yamazaki S, Hasegawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet*. Februar 1987;164(2):155–8.
62. Saito T, Ishii S, Abe T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, u. a. Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription. *Transplant Proc*. Februar 2001;33(1–2):849.
63. Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, u. a. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2001;8(5):461–8.
64. Yamada F, Saito T, Abe T, Tsuchiya T, Sato Y, Kenjo A, u. a. Ischemic preconditioning enhances regenerative capacity of hepatocytes in long-term ischemically damaged rat livers. *J Gastroenterol Hepatol*. November 2007;22(11):1971–7.
65. Clavien P-A, Selzner M, Rüdiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, u. a. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg*. Dezember 2003;238(6):843-850; discussion 851-852.

66. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg*. August 2000;232(2):155–62.
67. Choukèr A, Schachtner T, Schauer R, Dugas M, Löhe F, Martignoni A, u. a. Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *Br J Anaesth*. August 2004;93(2):204–11.
68. Heizmann O, Loehe F, Volk A, Schauer RJ. Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. *Eur J Med Res*. 25. Februar 2008;13(2):79–86.
69. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Januar 2001;280(1):H198-207.
70. Kadono J, Hamada N, Fukueda M, Ishizaki N, Kaieda M, Gejima K, u. a. Advantage of Ischemic Preconditioning for Hepatic Resection in Pigs. *J Surg Res*. August 2006;134(2):173–81.
71. Schiesser M, Wittert A, Nieuwenhuijs VB, Morphett A, Padbury RTA, Barritt GJ. Intermittent Ischemia but Not Ischemic Preconditioning Is Effective in Restoring Bile Flow After Ischemia Reperfusion Injury in the Livers of Aged Rats. *J Surg Res*. März 2009;152(1):61–8.
72. Vriens MR, Marinelli A, Harinck HIJ, Zwinderman KH, van de Velde CJH. The role of allopurinol in human liver ischemia/reperfusion injury: a prospective randomized clinical trial. *Hepatogastroenterology*. August 2002;49(46):1069–73.
73. Yamashita Y, Shimada M, Hamatsu T, Rikimaru T, Tanaka S, Shirabe K, u. a. Effects of preoperative steroid administration on surgical stress in hepatic resection: prospective randomized trial. *Arch Surg Chic Ill 1960*. März 2001;136(3):328–33.
74. Muratore A, Ribero D, Ferrero A, Bergero R, Capussotti L. Prospective randomized study of steroids in the prevention of ischaemic injury during hepatic resection with pedicle clamping. *Br J Surg*. Januar 2003;90(1):17–22.
75. Aldrighetti L, Pulitanò C, Arru M, Finazzi R, Catena M, Soldini L, u. a. Impact of preoperative steroids administration on ischemia-reperfusion injury and systemic responses in liver surgery: a prospective randomized study. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. Juni 2006;12(6):941–9.
76. Orii R, Sugawara Y, Hayashida M, Yamada Y, Chang K, Takayama T, u. a.

Effects of amrinone on ischaemia-reperfusion injury in cirrhotic patients undergoing hepatectomy: a comparative study with prostaglandin E1. *Br J Anaesth*. September 2000;85(3):389–95.

77. Bartels M, Biesalski HKHK, Engelhart K, Sendlhofer G, Rehak P, Nagel E. Pilot study on the effect of parenteral vitamin E on ischemia and reperfusion induced liver injury: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *Clin Nutr Edinb Scotl*. Dezember 2004;23(6):1360–70.

78. Kostopanagiotou G, Pandazi AK, Andreadou I, Markantonis SL, Niokou D, Teloudis A, u. a. Effects of mannitol in the prevention of lipid peroxidation during liver resection with hepatic vascular exclusion. *J Clin Anesth*. Dezember 2006;18(8):570–4.

79. Settaf A, Zaim N, Bellouch M, Tillement JP, Morin D. [Trimetazidine prevents ischemia-reperfusion injury in hepatic surgery under vascular clamping]. *Thérapie*. Oktober 2001;56(5):569–74.

80. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, u. a. A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann Surg*. Dezember 2008;248(6):909–18.

81. Braun S, Plitzko G, Bicknell L, van Caster P, Schulz J, Barthuber C, u. a. Pretreatment with helium does not attenuate liver injury after warm ischemia-reperfusion. *Shock Augusta Ga*. Mai 2014;41(5):413–9.

82. Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Albano E, Carini R. Molecular mechanisms of liver preconditioning. *World J Gastroenterol WJG*. 28. Dezember 2010;16(48):6058–67.

83. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, u. a. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology Baltim Md*. Dezember 2001;34(6):1164–73.

84. Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology Baltim Md*. Juli 2002;36(1):94–102.

85. Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Roselló-Catafau J, Gelpí E, u. a. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation*. 27. Februar 2001;71(4):529–36.

86. Adam ANI. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Gen Med*. 31. Oktober 2014;7:483–9.
87. Fernández L. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: Role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology*. September 2002;36(3):562–72.
88. Funaki H, Shimizu K, Harada S-I, Tsuyama H, Fushida S, Tani T, u. a. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation*. 27. August 2002;74(4):551–6.
89. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. August 2007;1773(8):1358–75.
90. Tacchini L, Cairo G, De Ponti C, Massip M, Rosellò-Catafau J, Peralta C. Up regulation of IL-6 by ischemic preconditioning in normal and fatty rat livers: association with reduction of oxidative stress. *Free Radic Res*. November 2006;40(11):1206–17.
91. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, u. a. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med*. September 1996;128(3):251–8.
92. Patel A, van de Poll MCG, Greve JWM, Buurman WA, Fearon KCH, McNally SJ, u. a. Early stress protein gene expression in a human model of ischemic preconditioning. *Transplantation*. 27. November 2004;78(10):1479–87.
93. Liu Y, Sun X-J, Liu J, Kang Z-M, Deng X-M. Heme oxygenase-1 could mediate the protective effects of hyperbaric oxygen preconditioning against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Oktober 2011;38(10):675–82.
94. Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*. Februar 2000;37(1–2):1–11.
95. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*. August 2001;7(8):345–50.
96. Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, u. a. Adenosine-dependent activation of hypoxia-inducible factor-1 induces late preconditioning in liver cells. *Hepatology*. Juli 2008;48(1):230–9.
97. Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H, Ito H, Yamamoto S, u. a. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in

mice. *Transplant Proc.* November 2000;32(7):2310–3.

98. Tejima K, Arai M, Ikeda H, Tomiya T, Yanase M, Inoue Y, u. a. Ischemic preconditioning protects hepatocytes via reactive oxygen species derived from Kupffer cells in rats. *Gastroenterology.* November 2004;127(5):1488–96.

99. Wilkins M. Proteomics data mining. *Expert Rev Proteomics.* Dezember 2009;6(6):599–603.

100. 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.* 1975;26(3):231–43.

101. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 25. Mai 1975;250(10):4007–21.

102. Kenrick KG, Margolis J. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem.* 1970;33(1):204–207.

103. Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis.* April 2000;21(6):1104–15.

104. Stasyk T, Huber LA. Zooming in: Fractionation strategies in proteomics. *PROTEOMICS.* Dezember 2004;4(12):3704–16.

105. Wu S, Wan P, Li J, Li D, Zhu Y, He F. Multi-modality of pI distribution in whole proteome. *PROTEOMICS.* Januar 2006;6(2):449–55.

106. Chinese Human Liver Proteome Profiling Consortium. First insight into the human liver proteome from PROTEOME(SKY)-LIVER(Hu) 1.0, a publicly available database. *J Proteome Res.* Januar 2010;9(1):79–94.

107. Sun A, Jiang Y, Wang X, Liu Q, Zhong F, He Q, u. a. Liverbase: A Comprehensive View of Human Liver Biology. *J Proteome Res.* 4. Januar 2010;9(1):50–8.

108. He F. Human Liver Proteome Project Plan, Progress, and Perspectives. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(12):1841–1848.

109. Xu C, Zhang X, Yu C, Lu G, Chen S, Xu L, u. a. Proteomic analysis of hepatic ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning in mice revealed the protective role of ATP5 β . *PROTEOMICS.* Januar 2009;9(2):409–19.

110. Avellini C, Baccarani U, Trevisan G, Cesaratto L, Vascotto C, D'Aurizio F, u. a. Redox Proteomics and Immunohistology to Study Molecular Events During Ischemia-Reperfusion in Human Liver. *Transplant Proc.* Juli 2007;39(6):1755–60.

111. Hirsch J, Hansen KC, Choi S, Noh J, Hirose R, Roberts JP, u. a. Warm ischemia-induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats. *Mol Cell Proteomics MCP*. Juni 2006;5(6):979–86.
112. Emadali A, Muscatelli-Groux B, Delom F, Jenna S, Boismenu D, Sacks DB, u. a. Proteomic analysis of ischemia-reperfusion injury upon human liver transplantation reveals the protective role of IQGAP1. *Mol Cell Proteomics MCP*. Juli 2006;5(7):1300–13.
113. Oshima R, Nakano H, Katayama M, Sakurai J, Wu W, Koizumi S, u. a. Modification of the Hepatic Mitochondrial Proteome in Response to Ischemic Preconditioning following Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Liver. *Eur Surg Res*. 2008;40(3):247–55.
114. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. November 1951;193(1):265–75.
115. Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull-Korean Chem Soc*. 2002;23(11):1511–1512.
116. Dyballa N, Metzger S. Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. *J Vis Exp* 3. August 2009, doi: 10.3791/1431
117. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*. 1. Oktober 1989;246:64–71.
118. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*. November 1984;11(11):601.
119. Cooper GM. *The Cell*. 2nd Aufl. Sinauer Associates; 2000.
120. Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*. April 2008;1783(4):535–48.
121. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 30. Mai 2006;2(2):409–30.
122. Read R, Hansen G, Kramer J, Finch R, Li L, Vogel P. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase type 5 (Entpd5)-deficient mice develop progressive hepatopathy, hepatocellular tumors, and spermatogenic arrest. *Vet Pathol*. Mai 2009;46(3):491–504.

123. Enninga J, Levay A, Fontoura BMA. Sec13 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and stably interacts with Nup96 at the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol.* Oktober 2003;23(20):7271–84.
124. Hall L, Martinus RD. Hyperglycaemia and oxidative stress upregulate HSP60 & HSP70 expression in HeLa cells. *SpringerPlus.* 2013;2:431.
125. Bissig C, Gruenberg J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol.* Januar 2014;24(1):19–25.
126. Missotten M, Nichols A, Rieger K, Sadoul R. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ.* Februar 1999;6(2):124–9.
127. Vito P, Pellegrini L, Guet C, D'Adamio L. Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca²⁺-dependent reaction. *J Biol Chem.* 15. Januar 1999;274(3):1533–40.
128. Schliess F, Häussinger D. The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biol Chem.* April 2002;383(3–4):577–83.
129. Zhu K, Zhao J, Lubman DM, Miller FR, Barder TJ. Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Anal Chem.* 1. Mai 2005;77(9):2745–55.
130. Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada K-I, u. a. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *Eur J Biochem FEBS.* Dezember 2002;269(23):5931–8.
131. Huber LA. Organelle Proteomics: Implications for Subcellular Fractionation in Proteomics. *Circ Res.* 16. Mai 2003;92(9):962–8.
132. Gauthier DJ, Sobota JA, Ferraro F, Mains RE, Lazure C. FLOW CYTOMETRY-ASSISTED PURIFICATION AND PROTEOMIC ANALYSIS OF THE CORTICOTROPES DENSE-CORE SECRETORY GRANULES. *Proteomics.* September 2008;8(18):3848–61.
133. Ndozangue-Touriguine O, Hamelin J, Bréard J. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 1. Juli 2008;76(1):11–8.
134. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition [Internet]. 2000 [zitiert 6. Januar 2014]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9932/>
135. Papakonstanti EA, Stournaras C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* Juni 2008;582(14):2120–7.

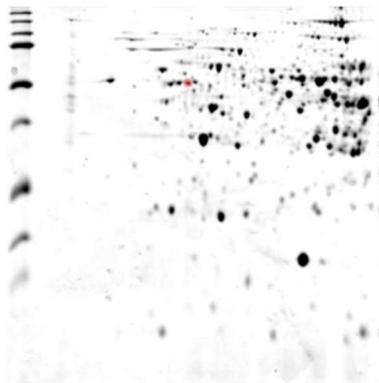
136. Keller M, Gerbes AL, Kulhanek-Heinze S, Gerwig T, Grutzner U, van Rooijen N, u. a. Hepatocyte cytoskeleton during ischemia and reperfusion--influence of ANP-mediated p38 MAPK activation. *World J Gastroenterol WJG*. 21. Dezember 2005;11(47):7418–29.
137. Nakamura Y, Miura T, Nakano A, Ichikawa Y, Yano T, Kobayashi H, u. a. Role of microtubules in ischemic preconditioning against myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1. November 2004;64(2):322–30.
138. Sergi C, Abdualmjid R, Abuetabh Y. Canine Liver Transplantation Model and the Intermediate Filaments of the Cytoskeleton of the Hepatocytes. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321507/>
139. Tiriveedhi V, Conzen KD, Liaw-Conlin J, Upadhya G, Malone J, Townsend RR, u. a. The role of molecular chaperonins in warm ischemia and reperfusion injury in the steatotic liver: a proteomic study. *BMC Biochem*. 2012;13:17.
140. Shinohara H, Tanaka A, Fujimoto T, Hatano E, Satoh S, Fujimoto K, u. a. Disorganization of microtubular network in postischemic liver dysfunction: its functional and morphological changes. *Biochim Biophys Acta*. 7. Oktober 1996;1317(1):27–35.
141. Sakai J, Ishikawa H, Kojima S, Satoh H, Yamamoto S, Kanaoka M. Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. *PROTEOMICS*. Juli 2003;3(7):1318–24.
142. Wolff G, Truse R, Decking U. Extracellular Adenosine Formation by Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Is No Essential Trigger for Early Phase Ischemic Preconditioning. *PloS One*. 2015;10(8):e0135086.
143. Jensen D, Schekman R. COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J Cell Sci*. 13. Dezember 2010;124(1):1–4.
144. Strappazzon F, Torch S, Chatellard-Causse C, Petiot A, Thibert C, Blot B, u. a. Alix is involved in caspase 9 activation during calcium-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 18. Juni 2010;397(1):64–9.
145. Penna C, Perrelli M-G, Raimondo S, Tullio F, Merlino A, Moro F, u. a. Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts. *Biochim Biophys Acta*. Juli 2009;1787(7):794–801.
146. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, u. a. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 4. Oktober 2005;112(14):2143–8.

147. Chu R, Lim H, Brumfield L, Liu H, Herring C, Ulintz P, u. a. Protein profiling of mouse livers with peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *Mol Cell Biol.* Juli 2004;24(14):6288–97.
148. Sun J, Sun L, Zhang N, Lu X, Zhang H. A20 is up-regulated in primary mouse hepatocytes subjected to hypoxia and reperfusion. *Cell Biochem Funct.* Dezember 2012;30(8):683–6.
149. Ravingerová T, Carnická S, Ledvényiová V, Barlaka E, Galatou E, Chytilová A, u. a. Upregulation of genes involved in cardiac metabolism enhances myocardial resistance to ischemia/reperfusion in the rat heart. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov.* 12. Dezember 2013;62 Suppl 1:S151-163.

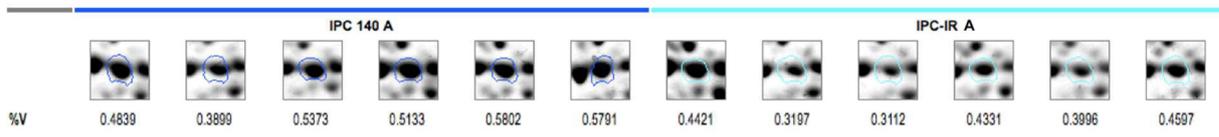
6 Anhang

Im Folgenden sind alle differentiellen *spots* (DS1-8) mit Angabe der Intensität in %Volumen (%Vol) aus jedem technischen (A, B, C) und biologischen (n=6) Replikat dargestellt. Die Lokalisation der *spots* im Gel ist exemplarisch in einem Gel-Scan abgebildet (rote Markierung). Zusätzlich sind je technischer Replikatreihe und angestelltem Vergleich tabellarisch Mittelwert (%Vol), Median (%Vol), relative Standardabweichung (RSD), Minimum (%Vol), Maximum (%Vol), p-Wert (durch t-Test ermittelt) sowie die *Ratio* beim Vergleich dargestellt.

DS1:

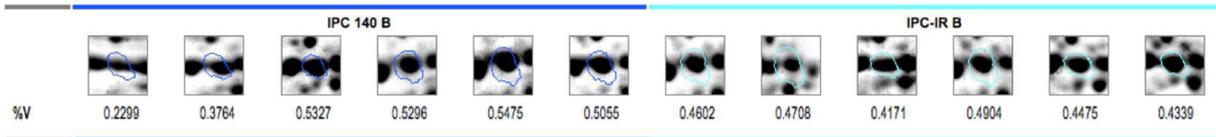


DS1 (A Replikate)



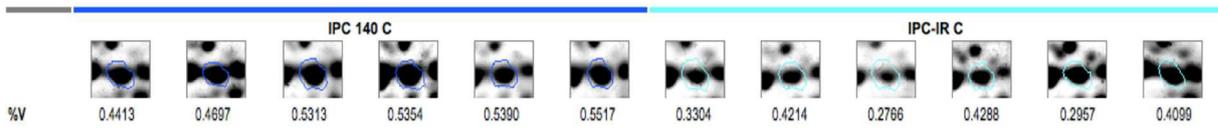
	IPC140 A	IPC-IR A
<i>Ratio</i>		0,767
p-Wert		0,012
RSD	12,674	14,844
Mittel	0,514	0,394
Median	0,525	0,416
Maximum	0,580	0,460
Minimum	0,390	0,311

DS1 (B Replikate)



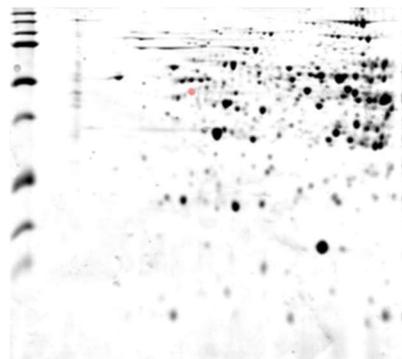
	IPC140 B	IPC-IR B
<i>Ratio</i>		0,999
p-Wert		0,996
RSD	25,382	5,287
Mittel	0,454	0,453
Median	0,518	0,454
Maximum	0,548	0,490
Minimum	0,230	0,417

DS1 (C Replikate)

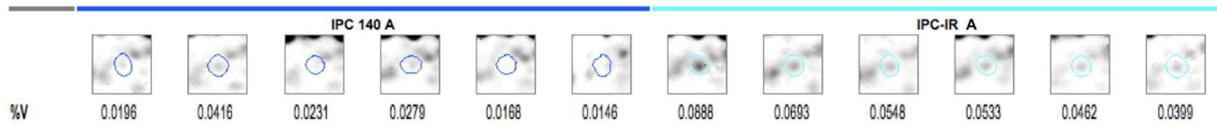


	IPC140 C	IPC-IR C
<i>Ratio</i>		0,705
p-Wert		<0,001
RSD	7,987	17,158
Mittel	0,511	0,360
Median	0,533	0,370
Maximum	0,552	0,429
Minimum	0,441	0,277

DS2:

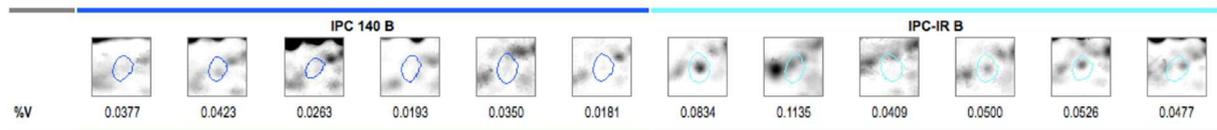


DS2 (A Replikate)



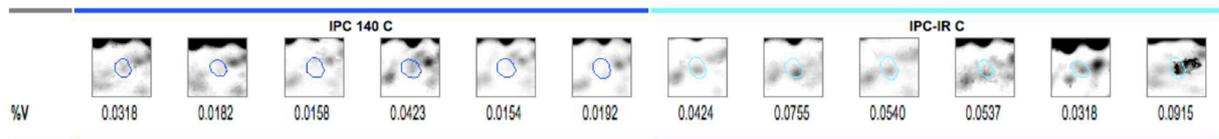
	IPC140 A	IPC-IR A
<i>Ratio</i>		2,454
p-Wert		0,002
RSD	37,569	27,575
Mittel	0,024	0,059
Median	0,021	0,054
Maximum	0,042	0,089
Minimum	0,015	0,040

DS2 (B Replikate)



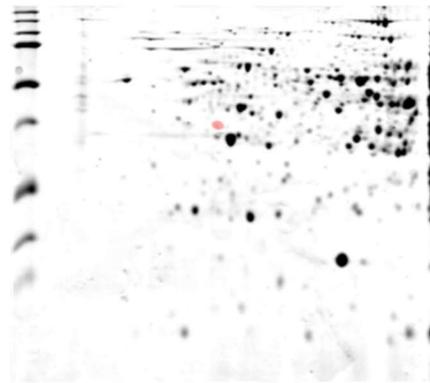
	IPC140 B	IPC-IR B
<i>Ratio</i>		2,173
p-Wert		0,017
RSD	30,864	39,638
Mittel	0,030	0,065
Median	0,031	0,051
Maximum	0,042	0,113
Minimum	0,018	0,041

DS2 (C Replikate)

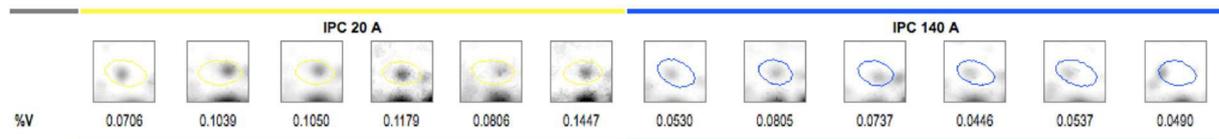


	IPC140 C	IPC-IR C
<i>Ratio</i>		2,445
p-Wert		0,006
RSD	41,746	34,344
Mittel	0,024	0,058
Median	0,019	0,054
Maximum	0,042	0,092
Minimum	0,015	0,032

DS 3:

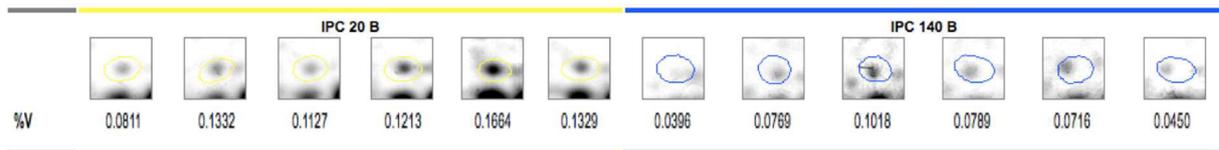


DS3 (A Replikate)



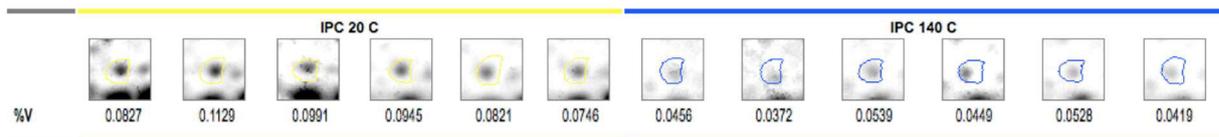
	IPC20 A	IPC140 A
<i>Ratio</i>		0,569
p-Wert		0,005
RSD	23,313	22,378
Mittel	0,104	0,059
Median	0,104	0,053
Maximum	0,145	0,080
Minimum	0,071	0,045

DS3 (B Replikate)



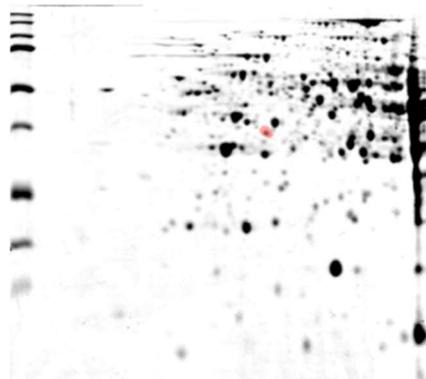
	IPC20 B	IPC140 B
<i>Ratio</i>		0,553
p-Wert		0,004
RSD	20,570	30,663
Mittel	0,125	0,069
Median	0,127	0,074
Maximum	0,166	0,102
Minimum	0,081	0,040

DS3 (C Replikate)

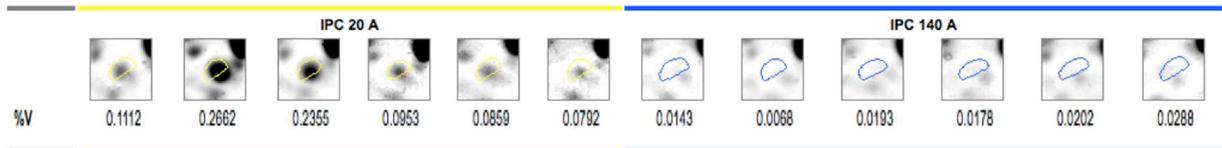


	IPC20 C	IPC140 C
<i>Ratio</i>		0,506
p-Wert		<0,001
RSD	13,994	12,698
Mittel	0,091	0,046
Median	0,089	0,045
Maximum	0,113	0,054
Minimum	0,075	0,037

DS4:

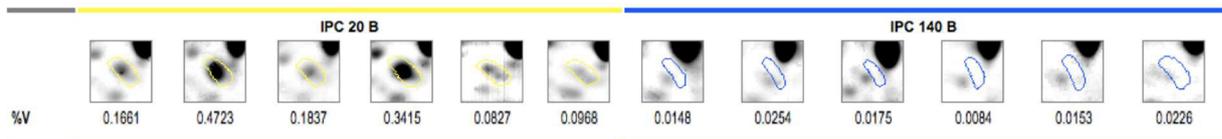


DS4 (A Replikate)



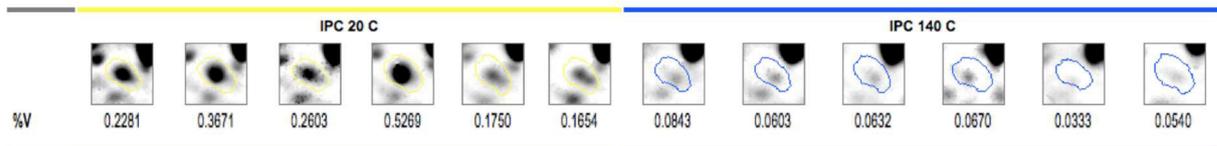
	IPC20 A	IPC140 A
<i>Ratio</i>		0,123
p-Wert		0,004
RSD	51,942	37,013
Mittel	0,146	0,018
Median	0,103	0,019
Maximum	0,266	0,029
Minimum	0,079	0,007

DS4 (B Replikate)



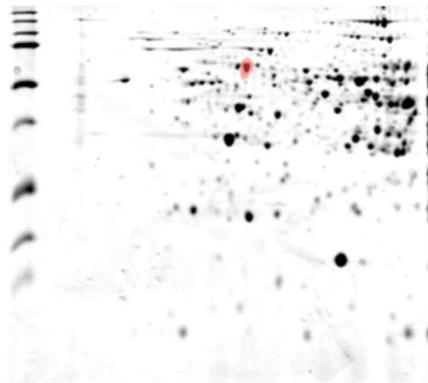
	IPC20 B	IPC140 B
<i>Ratio</i>		0,077
p-Wert		0,008
RSD	62,264	31,854
Mittel	0,224	0,017
Median	0,175	0,016
Maximum	0,472	0,025
Minimum	0,083	0,008

DS4 (C Replikate)

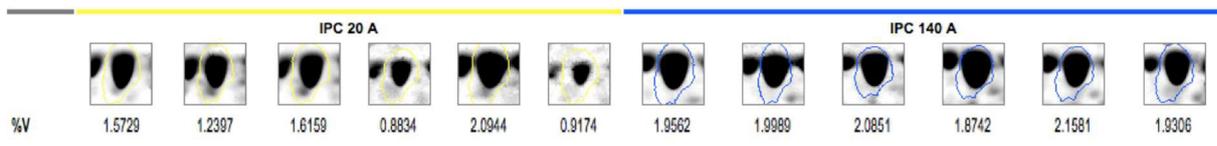


	IPC20 C	IPC140 C
<i>Ratio</i>		0.210
p-Wert		0.003
RSD	43,935	25,322
Mittel	0,287	0,060
Median	0,244	0,062
Maximum	0,527	0,084
Minimum	0,165	0.007

DS5a und b:

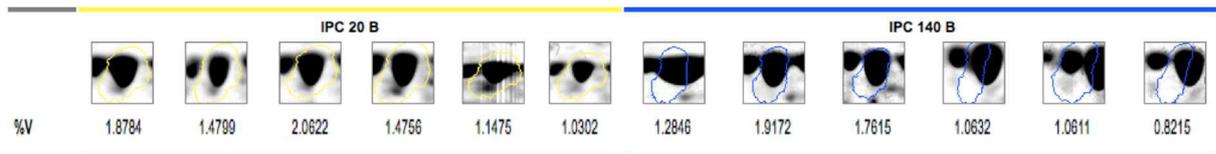


DS5a (A Replikate)



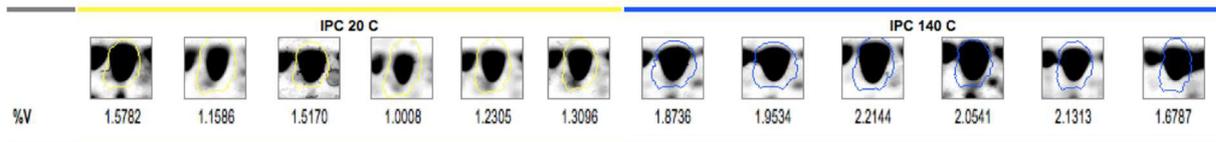
	IPC20 A	IPC140 A
<i>Ratio</i>		1,442
p-Wert		0,010
RSD	30,629	4,777
Mittel	1,387	2,001
Median	1,406	1,978
Maximum	2,094	2,158
Minimum	0,883	1,874

DS5a (B Replikate)



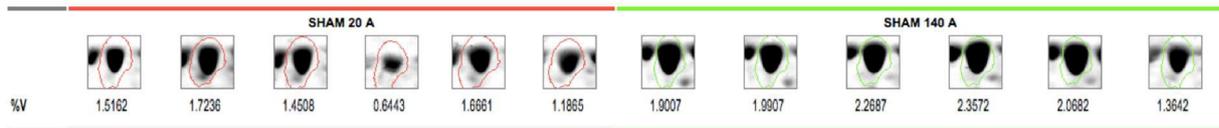
	IPC20 B	IPC140 B
<i>Ratio</i>		0,872
p-Wert		0,439
RSD	24,210	29,935
Mittel	1,512	1,318
Median	1,478	1,174
Maximum	2,062	1,917
Minimum	1,030	0,822

DS5a (C Replikate)



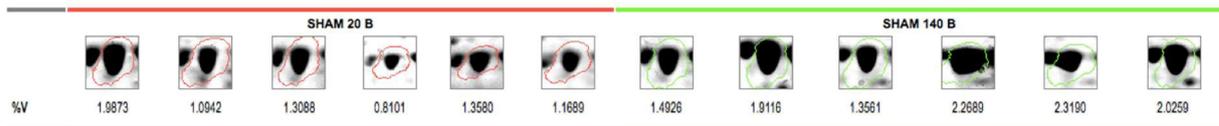
	IPC20 C	IPC140 C
<i>Ratio</i>		1,527
p-Wert		<0,001
RSD	15,361	8,874
Mittel	1,299	1,984
Median	1,270	2,004
Maximum	1,578	2,214
Minimum	1,001	1,679

DS5b (A Replikate)



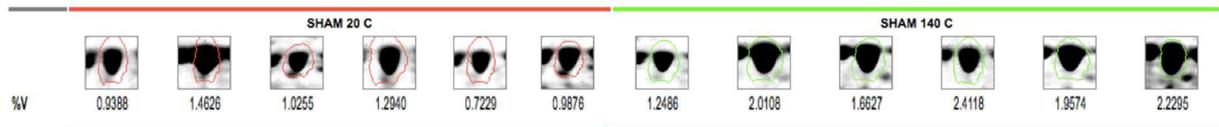
	SHAM20 A	SHAM140 A
<i>Ratio</i>		1,460
p-Wert		0,016
RSD	26,772	16,116
Mittel	1,365	1,992
Median	1,483	2,029
Maximum	1,724	2,357
Minimum	0,644	1,364

DS5b (B Replikate)



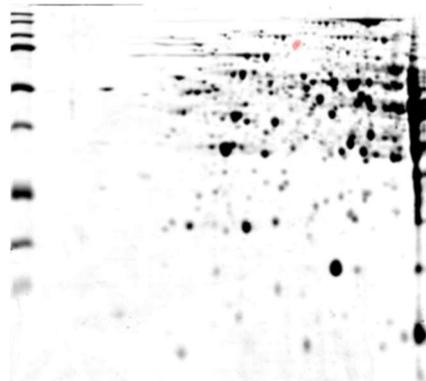
	SHAM20 B	SHAM140 B
<i>Ratio</i>		1,472
p-Wert		0,024
RSD	27,896	19,133
Mittel	1,288	1,896
Median	1,239	1,969
Maximum	1,987	2,319
Minimum	0,810	1,356

DS5b (C Replikate)

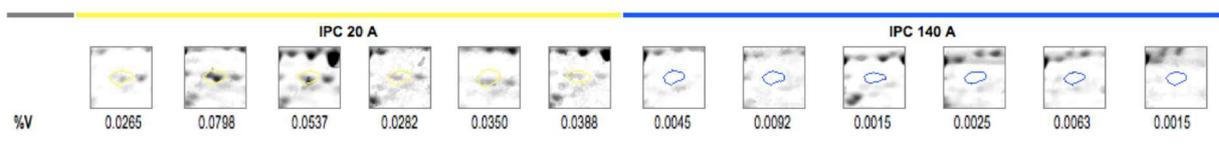


	SHAM20 C	SHAM140 C
<i>Ratio</i>		1,791
p-Wert		0,002
RSD	22,557	19,766
Mittel	1,072	1,920
Median	1,007	1,984
Maximum	1,463	2,412
Minimum	0,723	1,249

DS6:

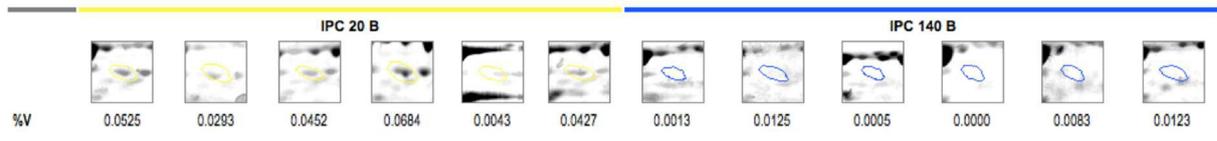


DS6 (A Replikate)



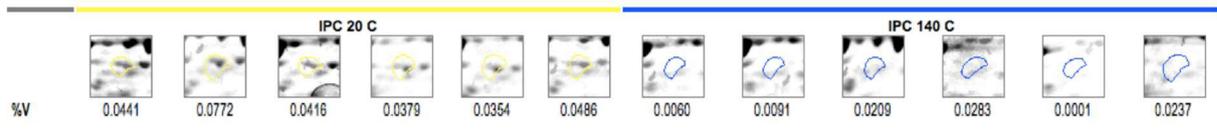
	IPC20 A	IPC140 A
<i>Ratio</i>		0,097
p-Wert		< 0,001
RSD	42,198	65,473
Mittel	0,044	0,004
Median	0,037	0,004
Maximum	0,080	0,009
Minimum	0,027	0,002

DS6 (B Replikate)



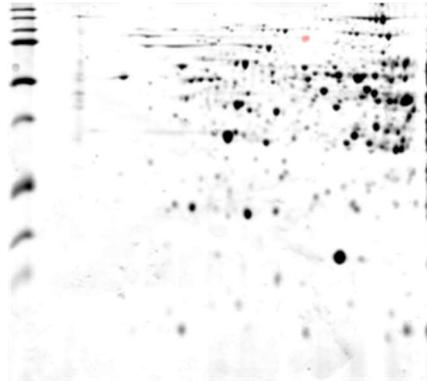
	IPC20 B	IPC140 B
<i>Ratio</i>		0,144
p-Wert		0,004
RSD	49,377	92,680
Mittel	0,040	0,006
Median	0,044	0,005
Maximum	0,068	0,013
Minimum	0,004	0,000

DS6 (C Replikate)

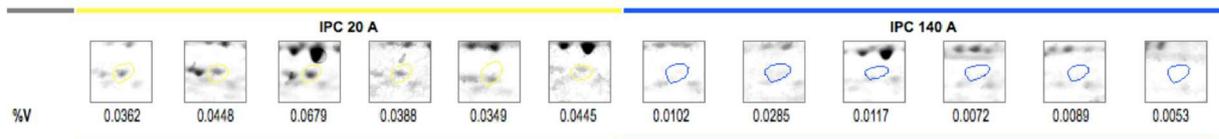


	IPC20 C	IPC140 C
<i>Ratio</i>		0,309
p-Wert		0,002
RSD	29,376	69,564
Mittel	0,047	0,015
Median	0,043	0,015
Maximum	0,077	0,028
Minimum	0,035	0,000

DS7:

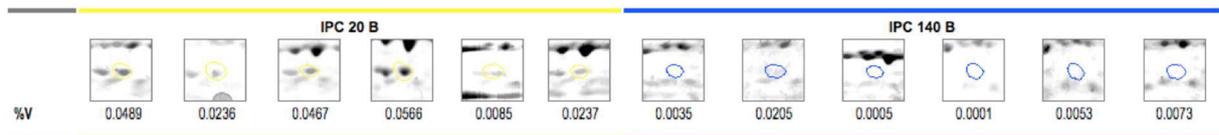


DS7 (A Replikate)



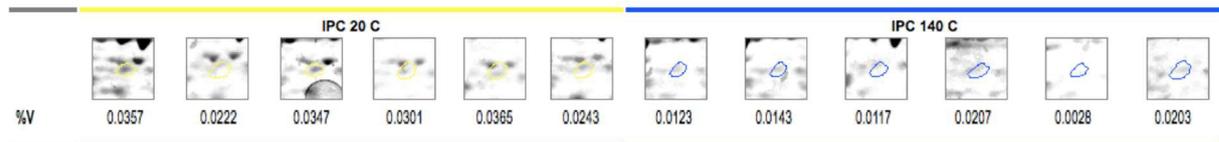
	IPC20 A	IPC140 A
<i>Ratio</i>		0,269
p-Wert		<0,001
RSD	24,986	64,286
Mittel	0,044	0,012
Median	0,042	0,010
Maximum	0,068	0,029
Minimum	0,035	0,005

DS7 (B Replikate)



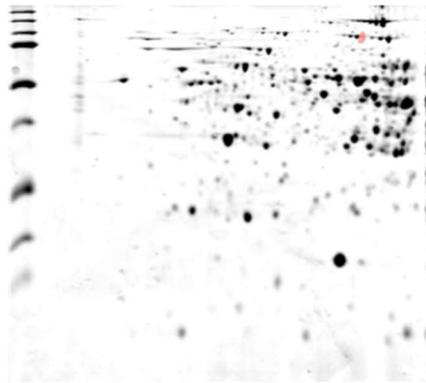
	IPC20 B	IPC140 B
<i>Ratio</i>		0,179
p-Wert		0,006
RSD	49,384	110,356
Mittel	0,035	0,006
Median	0,035	0,004
Maximum	0,057	0,020
Minimum	0,008	0,000

DS7 (C Replikate)

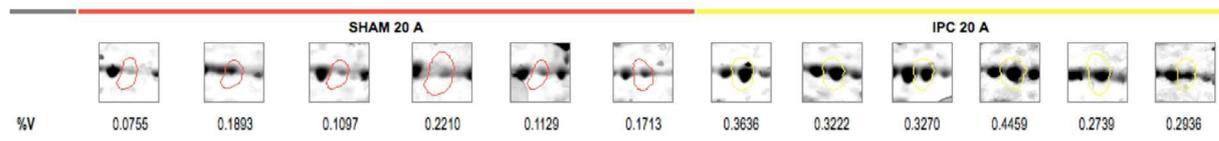


	IPC20 C	IPC140 C
<i>Ratio</i>		0,447
p-Wert		<0,001
RSD	18,347	44,059
Mittel	0,031	0,014
Median	0,032	0,013
Maximum	0,037	0,021
Minimum	0,022	0,003

DS8:

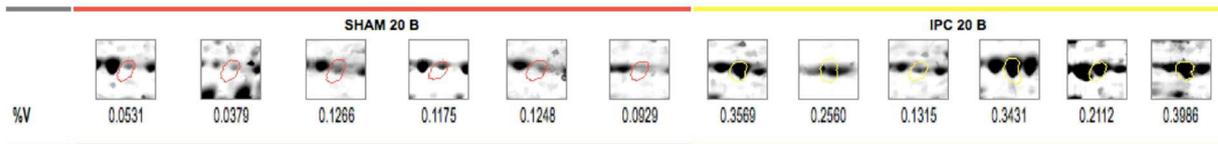


DS8 (A Replikate)



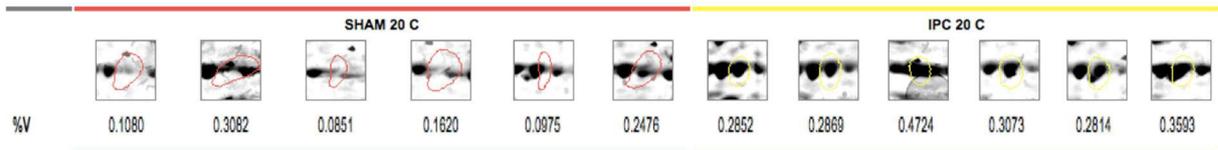
	SHAM20 A	IPC20 A
<i>Ratio</i>		2,303
p-Wert		<0,001
RSD	34,686	16,551
Mittel	0,147	0,338
Median	0,142	0,325
Maximum	0,221	0,446
Minimum	0,076	0,274

DS8 (B Replikate)



	SHAM20 B	IPC20 B
<i>Ratio</i>		3,070
p-Wert		0,002
RSD	38,013	32,683
Mittel	0,092	0,283
Median	0,105	0,300
Maximum	0,127	0,399
Minimum	0,038	0,131

DS8 (C Replikate)



	SHAM20 C	IPC20 C
<i>Ratio</i>		1,976
p-Wert		0,007
RSD	49,473	20,523
Mittel	0,168	0,332
Median	0,135	0,297
Maximum	0,308	0,472
Minimum	0,085	0,281

7 Danksagung

Nach Jahren im Labor und am Schreibtisch liegt sie nun vor: meine Dissertation. Ich möchte in ein paar Worten denjenigen danken, ohne die dieses Projekt wohl nie zur Vollendung gefunden hätte.

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Inge Bauer, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und ihren Doktoranden eine großartige Betreuung ihrer wissenschaftlichen Projekte Zuteil werden ließ. Auch meiner Betreuerin Dr. Sabine Metzger danke ich für die tolle Zeit im Labor und die große Unterstützung. 11.30 Uhr ist trotzdem zu früh zum Mittagessen! Priv.-Doz. Dr. Sebastian Braun danke ich für die Etablierung des Versuchsprotokolls und damit der Grundlage für diese Arbeit. Ich danke insbesondere meinen Arbeitsgruppen Kollegen Thorsten Strahl, Felix Stelzner und natürlich Frau Dr. Nadine Dyballa für das kollegiale Umfeld, die Inspiration und die lustigen Momente im Labor.

Ich danke meinem verstorbenen Vater, der mich immer motiviert und bedingungslos unterstützt hat. Auch der Rückhalt meiner Mutter war stets eine verlässliche Konstante und alles andere als selbstverständlich. Ich danke meiner lieben Patentante Karin für ihre Unterstützung, die sie mir, so lange ich mich erinnern kann, zukommen ließ.