

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

**Einfluss einer an der Rattenleber induzierten warmen partiellen
Ischämie mit Reperfusion und einer ischämischen
Präkonditionierung auf das hepatische zytosolische
Phosphoproteom**

Dissertation

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

vorgelegt von
Felix Stelzner

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter: PD Dr. med. Simon Thelen

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 bearbeitet ein Teilprojekt der o.g. Studie.

Zusammenfassung

Im klinischen Alltag wird die Leber in verschiedenen Situationen einer Ischämie und einer darauffolgenden Reperfusion (IR) ausgesetzt. Sowohl die Ischämie als auch die Reperfusion führen zu einem hepatozellulären Schaden. Die ischämische Präkonditionierung (IPC) ist ein Verfahren, welches einen IR-induzierten Schaden reduziert. Durch eine kurze, subletale IR wird die Toleranz des Gewebes gegen einen IR-Schaden gesteigert. Die molekularen Mechanismen, die zu dieser Organprotektion führen, sind nur zum Teil verstanden. Es existieren Hinweise auf eine Beteiligung posttranslationaler Proteinmodifikationen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss hepatischer IR und IPC auf das hepatische zytosolische Proteom und Phosphoproteom zu analysieren. Männliche Wistar Ratten wurden hierzu operiert und eine partielle, warme Leberischämie induziert. Die IPC bestand aus zehn Minuten Ischämie, gefolgt von zehn Minuten Reperfusion. Die IR bestand aus 60 min Ischämie und 60 min Reperfusion. Zu zwei Untersuchungszeitpunkten, unmittelbar nach Beendigung der IPC und nach Beendigung der IR bzw. zu den entsprechenden Zeitpunkten bei schein-operierten Kontrollen wurde Lebergewebe zur Proteinanalytik entnommen. Mittels differentieller Zentrifugation erfolgte eine subzelluläre Fraktionierung. Die zytosolischen Proteine wurden isoliert und mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die sequentielle Färbung der 2D-Gele mit der *ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain* (ProQ-DPS) und einer hochsensitiven Coomassie-Färbung ermöglichte die Analyse differentieller Phosphorylierung bzw. Expression von Proteinen. Differentiell regulierte Proteine wurden mittels *Electrospray ionization* (ESI) Massenspektrometrie sowie mittels Orbitrap Massenspektrometrie, gekoppelt mit einer *Ultra high performance liquid chromatography* (UHPLC) identifiziert. IPC führte zu einer signifikanten Reduktion des IR-Schadens, bestimmt anhand der Transaminasen im Serum. Insgesamt wurden 21 Phosphoproteinspots und 12 Coomassie-gefärbte Proteinspots differentiell reguliert. Hierbei hatte der zeitliche Verlauf des operativen Eingriffs den größten Einfluss auf die Phosphorylierung und Expression zytosolischer Proteine. Unter anderem wurden die 5-Oxoprolinase und die Carbamoylphosphat Synthase 1 vermindert und der eukaryote Elongationsfaktor 2 (eEF2) und das Hitzeschockprotein 60 vermehrt exprimiert. Der eEF2 und die Pyruvatkinase R/L wurden im zeitlichen Verlauf der Operation vermehrt und die Nicotinamidadenindinukleotid Kinase 2 und Regucalcin vermindert phosphoryliert. Unmittelbar nach der IPC ließ sich eine 4,3-fach vermehrte Expression von Serotransferrin feststellen. Eine IPC-induzierte differentielle Phosphorylierung ließ sich nicht detektieren. 15 differentielle regulierte Phosphoproteinspots und sechs differentielle regulierte Coomassie-gefärbte Proteinspots konnten aufgrund zu geringer Abundanz nicht massenspektrometrisch identifiziert werden. Es lässt sich schlussfolgern, dass das hepatische Proteom und Phosphoproteom in besonderem Maße von der Operation selbst beeinflusst wurde. Die vermehrte Expression von Serotransferrin lässt sich als IPC-induzierter antioxidativer Mechanismus der Leber interpretieren. Um die Bedeutung der identifizierten differentiellen Expression oder posttranslationalen Phosphorylierungen auf funktioneller Ebene zu erforschen, sind weiterführende Studien, z.B. mit entsprechenden Inhibitoren oder Aktivatoren, notwendig.

Abstract

In clinical practice the liver is exposed to ischemia and subsequent reperfusion (IR) in various situations. Both ischemia and reperfusion lead to hepatocellular damage. Ischemic preconditioning (IPC) is a method, which reduces an IR-induced damage. A short sublethal IR increases the tolerance of the tissue against IR damage. The molecular mechanisms leading to this organ defense are only partially understood. There is evidence of the involvement of posttranslational protein modifications. The aim of this study was to analyze the influence of hepatic IR and IPC on the hepatic cytosolic proteome and phosphoproteome. Male Wistar rats underwent surgery and a partial warm hepatic ischemia was induced. IPC consisted of ten minutes of ischemia, followed by ten minutes of reperfusion. IR consisted of 60 min of ischemia and 60 min of reperfusion. Immediately after the IPC stimulus and after IR and at the corresponding time points in sham-operated controls, liver tissue was removed for protein analysis. By means of differential centrifugation subcellular fractionation was performed. The cytosolic proteins were isolated and separated by 2D gel electrophoresis. The sequential staining of the 2D gels with the ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain (ProQ-DPS) and a highly sensitive Coomassie staining enabled the analysis of differential phosphorylation and expression of proteins. Differentially regulated proteins were identified by means of electrospray ionization (ESI) mass spectrometry as well as by orbitrap mass spectrometry coupled with ultra high performance liquid chromatography (UHPLC). IPC resulted in a significant reduction of IR damage determined by serum transaminases. A total of 21 phosphoprotein spots and 12 Coomassie-stained protein spots were differentially regulated. The temporal course of the surgical procedure had the greatest influence on the phosphorylation and expression of cytosolic proteins. 5-oxoprolinase and carbamoyl phosphate synthase 1 were reduced and eukaryote elongation factor 2 (eEF2) and heat shock protein 60 were expressed more intensively. EEF2 and pyruvate kinase R/L showed a higher phosphorylation status during the course of the operation. Phosphorylation of nicotinamide-adenine-dinucleotide kinase 2 and regucalcine was decreased. Immediately after IPC a 4.3-fold increased expression of serotransferrin could be observed. An IPC-induced differential phosphorylation could not be detected. 15 differentially regulated phosphoprotein spots and six differentially regulated Coomassie-stained protein spots could not be identified by mass spectrometry due to insufficient abundance. It can be concluded that the hepatic proteome and phosphoproteome was particularly influenced by the operative intervention itself. The increased expression of serotransferrin can be interpreted as an IPC-induced antioxidant mechanism of the liver. To investigate the significance of the identified differential expression or post-translational phosphorylation at a functional level further studies, e.g. with inhibitors or activators, are necessary.

Abkürzungsverzeichnis

2D DIGE	<i>Two-dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis</i>	CPS1	Carbamoylphosphat Synthase 1
ACN	Acetonitril	Cyt	Zytosolische Fraktion
AIF	Apoptose induzierender Faktor	DNS	Desoxyribonukleinsäure
Anis	Anisomycin	DTT	Dithiothreitol
ALT	Alanin-Aminotransferase	eEF2	eukaryoter Elongationsfaktor 2
AMP	Adenosin 5'-Monophosphat	eEF2K	eukaryoter Elongationsfaktor 2 Kinase
AMPK	Adenosin 5'-Monophosphat - aktivierte Proteinkinase	EGTA	Ethylenglycol- bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
AP	Alkalische Phosphatase	ERK	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase
APS	Ammoniumpersulfat	ESI	<i>Electrospray ionization</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase	GAPDH	Glycerinaldehyd-3 Phosphat Dehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat	GM-CSF	Granulozyten- Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat	HSP60	60 kDa Hitzeschockprotein
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum	IAA	Iodacetamid
BSA	Rinder Serumalbumin	ICAM-1	Interzelluläres Adhäsions- molekül-1
cAMP	Cyclisches Adenosin 5'- monophosphat	IEF	Isoelektrische Fokussierung
CHAPS	<i>3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio)-1 propanesulfonate</i>		

IFN-γ	Interferon- γ	Nu	Nukleäre Fraktion
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1	p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
IL-1	Interleukin-1	p.a.	<i>Pro analysi</i>
IL-6	Interleukin-6	PAA	Polyacrylamid
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
IPC	Ischämische Präkonditionierung	PAH	Phenylalaninhydroxylase
IPG	Immobilisierter pH-Gradient	PGE₁	Prostaglandin E ₁
IR	Ischämie Reperfusion	PGs	Prostaglandine
MAPKAP2	Mitogenaktivierte Proteinkinase- aktivierte Proteinkinase 2	PKA	Proteinkinase A
Mem	Membranenfraktion	PKRL	Pyruvatkinase R/L
Mi	Mitochondriale Fraktion	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
MS	Massenspektrometrie	ProQ DPS	<i>ProQ Diamond</i> <i>Phosphoprotein Gel Stain</i>
mRNA	Boten Ribonukleinsäure	PTM	Posttranslationale Modifikation
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier	PVDF	Polyvinylidenfluorid
MW	<i>Molecular Weight</i>	Q-TOF	<i>Quadrupole-Time of flight</i>
NADH	Nicotinamidadenin-dinukleotid	RGN	Regucalcin
Nck-1	Nicht-katalytische Region des Tyrosinkinase- Adapterproteins 1	RIPC	<i>Remote ischemic preconditioning</i>
		RNS	Ribonukleinsäure
		ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

RSD	<i>Relative standard deviation</i>	TCA	Trichloressigsäure
SAPK2	Stress-aktivierte Proteinkinase 2	Temed	Tetramethylethylendiamin
SB203580	Selektiver Inhibitor des p38- MAPK Signalwegs	TNF	Tumornekrosefaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat	TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
SERCA	Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums	TOF	<i>Time of flight</i>
SHAM	Scheinoperierte Tiere	UHPLC	<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>
SHVE	<i>Selective hepatic vascular exclusion</i>	ÜS	Überstand
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>	w/v	<i>weight/volume</i> [kg/m ³]
		XDH	Xanthindehydrogenase
		XO	Xanthinoxidase

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ischämie und Reperfusion der Leber	1
1.1.1	Klinischer Hintergrund.....	1
1.1.2	Pathogenese des Ischämie- und Reperfusionsschadens.....	1
1.2	Ischämische Präkonditionierung	4
1.2.1	Allgemeine Auswirkungen	4
1.2.2	Steigerung der Ischämietoleranz	5
1.2.3	Steigerung der Reperfusionstoleranz.....	6
1.2.4	IPC-Studien der Leber.....	7
1.3	Proteomstudien zur IPC und zur Ischämie und Reperfusion der Leber	8
1.4	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf das hepatische Phosphoproteom	9
1.5	Ziel der Arbeit	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Lebergewebe	12
2.1.1	Operation der Tiere.....	12
2.1.2	Versuchsprotokoll	13
2.2	Chemikalien und Geräte	14
2.3	Isolierung der Proteine	14
2.3.1	Homogenisierung.....	15
2.3.2	Subzelluläre Fraktionierung.....	15
2.3.3	Western blot Analyse	16
2.3.4	Proteinbestimmung.....	18
2.3.5	TCA/Aceton- Proteinfällung.....	19
2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese)	19
2.4.1	Resuspendierung der Proteinpellets.....	20
2.4.2	Isoelektrische Fokussierung.....	20
2.4.3	Polyacrylamid-Gele (PAA).....	21
2.4.4	Auftrennung nach Molekulargewicht	22
2.5	Eindimensionale Gelelektrophorese (1D-Gelelektrophorese)	22
2.6	Proteinfärbung	23
2.6.1	ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain (ProQ-DPS).....	24
2.6.2	ProQ-DPS Chargentest.....	24
2.6.3	Alkalische Dephosphorylierung	25

2.6.4	Kolloidale Coomassie Färbung	25
2.7	Vergleichende Analyse der 2D-Gele	26
2.8	Statistik	29
2.9	Identifikation der Proteine mittels Massenspektrometrie	29
2.9.1	Tryptischer in-Gel Verdau	29
2.9.2	Massenspektrometrie	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Reduktion der Transaminasen im Serum durch IPC	32
3.2	Isolierung der Leberproteine und Optimierung der 2D-Gelelektrophorese	33
3.3	Etablierung der Phosphatfärbung	35
3.4	Einfluss von IPC und IR auf das zytosolische Subproteom der Leber	37
3.4.1	Einfluss von IPC und IR auf das zytosolische Phosphoproteom	37
3.4.2	Einfluss von IPC und IR auf das zytosolische Proteom	48
3.5	Identifizierte Proteine	54
4	Diskussion	58
4.1	Reduktion des Ischämie- und Reperfusionsschadens der Leber durch IPC	59
4.2	Einfluss der reinen IPC auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine	59
4.3	Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Operation auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine	60
4.4	Einfluss einer Ischämie und Reperfusion mit und ohne IPC auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine	64
4.5	Kritik an der Methodik	65
4.5.1	Grenzen der 2D-Gelelektrophorese und der Proteinfärbungen	65
4.5.2	Grenzen der <i>Phosphoproteomics</i>	67
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	70
5	Literatur	71
6	Anhang	83
6.1	Optimierung der Proteinisolierung	83
6.2	Optimierung der 2D-Gelelektrophorese	84
6.2.1	Optimierung der ersten Dimension	84
6.2.2	Optimierung der zweiten Dimension	85

1 Einleitung

1.1 Ischämie und Reperfusion der Leber

1.1.1 Klinischer Hintergrund

Die Leber wird im klinischen Alltag in verschiedensten Situationen einer Ischämie und einer darauffolgenden Reperfusion (IR) ausgesetzt. Hierzu zählen unter anderem die Lebertransplantation, die Leber(teil)resektion (Pringle Manöver) und verschiedene Formen des Schocks. Eine IR führt insbesondere bei der Lebertransplantation zu einem hepatozellulären Schaden, der entscheidenden Einfluss auf das Outcome, gemessen an Organversagen und Abstoßung hat (1,2). Die Pathogenese des IR-induzierten Schadens ist überwiegend verstanden (3–5). Es gibt im klinischen Alltag jedoch noch keine standardmäßig angewandten Verfahren, die einen IR-Schaden der Leber reduzieren oder komplett verhindern können.

Eine Möglichkeit, einen hepatischen IR-Schaden zu reduzieren, bietet die ischämische Präkonditionierung (IPC). Hierbei wird durch eine oder mehrere Phasen einer kurzen, subletalen Ischämie mit Reperfusion die IR-Toleranz der Leber für eine darauffolgende, länger andauernde Ischämie erhöht. Die molekularen Mechanismen der hepatischen IPC sind bislang nicht zufriedenstellend geklärt (6–8).

Um die Entstehung einer IPC-induzierten Protektion besser einordnen zu können, werden im Folgenden zunächst die Pathomechanismen des ischämieinduzierten und des reperfusionsinduzierten Schadens beschrieben.

1.1.2 Pathogenese des Ischämie- und Reperfusionsschadens

Der ischämieinduzierte Schaden entsteht durch einen direkten Sauerstoffmangel, eine Hypoxie im Gewebe. Diese führt zu einer Störung des intrazellulären Energiestoffwechsels mit einer Depletion von Adenosintriphosphat (ATP). Im Rahmen der anaeroben Energiegewinnung werden saure Metaboliten, wie z.B. Laktat, angehäuft, die aufgrund der Ischämie nicht abtransportiert werden können. Es resultiert eine Azidose, die in Kombination mit einer gestörten, lysosomalen Membranintegrität zu einer zytoplasmatischen Aktivierung lysosomaler Enzyme führt (4). Die lysosomalen Enzyme bauen Proteine im Zytoplasma ab. Der ATP-Mangel hat darüber hinaus Einfluss auf das Membranpotential, welches durch die

Na^+ - K^+ -ATPase aufgebaut wird und während der Ischämie nicht aufrechterhalten werden kann. Die Natriumkonzentration steigt intrazellulär an, extrazelluläres Wasser folgt dem Natriumeinstrom und es resultiert ein intrazelluläres Ödem (4). Neben der Na^+ - K^+ -ATPase führt das Erliegen ATP-abhängiger Calciumtransportwege (Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher, Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA)) zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration. Calcium aktiviert Phospholipasen, Proteasen, Transglutaminasen und Endonukleasen, die Membranen, Zytoskelett und Chromatin abbauen (4). Die erhöhten zytoplasmatischen Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen aktivieren ATP-abhängige Transporter, die den Energiemangel weiter verstärken. Eine Reperfusion kann in dieser Situation den Energiestoffwechsel der Zelle wiederherstellen, setzt jedoch eine Anzahl weiterer zellschädigender Mechanismen in Gang. Wird nach einer begrenzten Ischämiezeit das Gewebe reperfundiert, so kommt es, abhängig von der Ischämiedauer und der Ischämietoleranz des Gewebes, zu einer Erholung des Energiestoffwechsels und des Zellmetabolismus (9). Die Mechanismen, die zu einem reperfusionssinduzierten Schaden führen, sind vielfältig und unterscheiden sich im Lebergewebe unter anderem aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen (Hepatozyten, Endothelzellen, Kupffer-Zellen, hepatische Sternzellen) von Reperfusionsschäden anderer Organe (z. B. Myokard).

Die Kaskade des hepatischen, reperfusionssinduzierten Schadens ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. In der Leber gehören die Endothelzellen unter den nicht-parenchymatösen Zellen zu den Zelltypen, die eine Hypoxie am wenigsten tolerieren (10,11). Sie reagieren mit der Expression von Adhäsionsmolekülen (12). Neutrophile Granulozyten adhärieren an Endothelzellen und migrieren in das Leberparenchym. Diese setzen toxische Substanzen wie z. B. Elastasen, Serin-Proteasen, Metalloproteinasen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei (Abb. 1) (5).

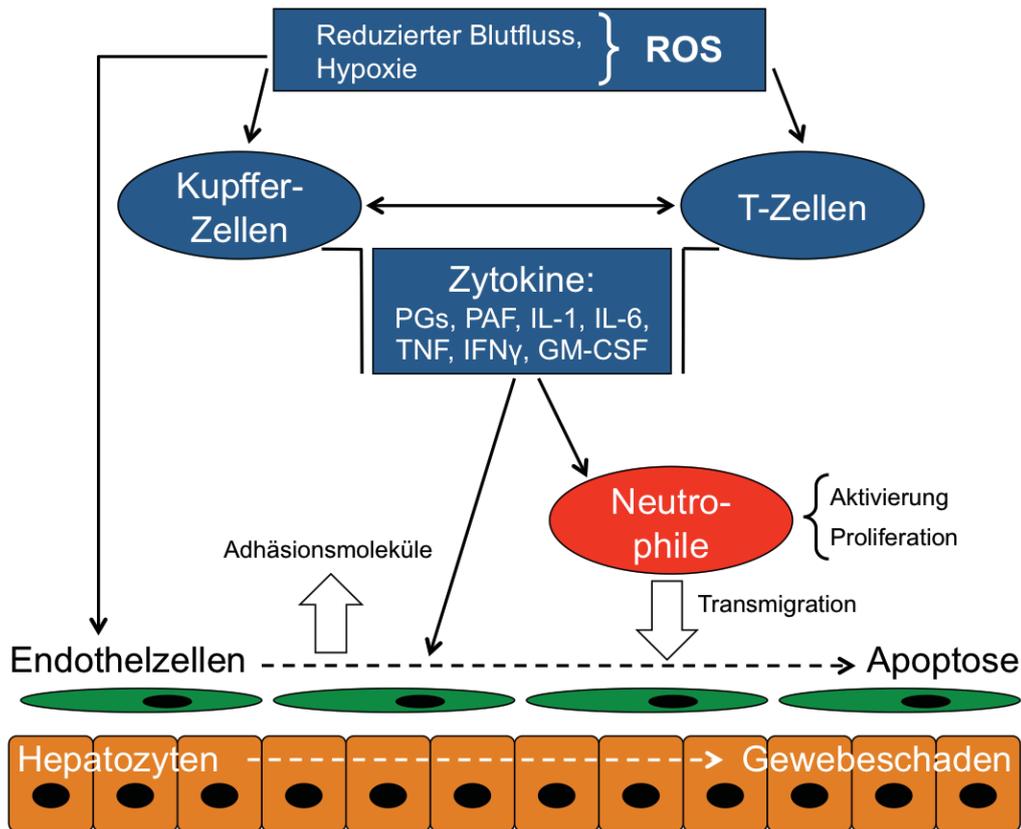


Abb. 1 **Kaskade des reperfusionsschadens modifiziert nach (5):** Hypoxie und ROS aktivieren Endothelzellen (Expression von Adhäsionsmolekülen, z. B. Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)) sowie Kupffer-Zellen und T-Lymphozyten (Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen). Neutrophile Granulozyten werden aktiviert, proliferieren und transmigrieren in das Lebergewebe. (ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, PGs: Prostaglandine, PAF: Plättchenaktivierender Faktor, IL-1: Interleukin-1, TNF: Tumornekrosefaktor, IL-6: Interleukin-6, IFN- γ : Interferon- γ , GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor)

Neben den Endothelzellen spielen Kupffer-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des reperfusionsschadens. Kupffer-Zellen sind die ortsständigen Makrophagen der Leber. Sie zeigen sich relativ ischämieresistent und werden während der Reperusionsphase aktiviert. Infolgedessen setzen sie proinflammatorische Mediatoren (z.B. Prostaglandine (PGs), plättchenaktivierender Faktor (PAF), Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interferon- γ (IFN- γ), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)), sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei (11,13). Die ROS haben einen großen Anteil an der Entstehung des Reperfusionsschadens (14). Zu ihnen zählen unter anderem das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese schädigen Enzyme, Nucleinsäuren, Zytoskelett, Zellmembranen und Lipide (15,16).

Man unterscheidet eine frühe von einer späten Phase des Reperfusionsschadens. In der frühen Phase werden ROS im Leberparenchym sowohl intrazellulär als auch extrazellulär gebildet. Mitochondrien sind in diesem Zusammenhang zum einen der Entstehungsort der intrazellulären ROS und zum anderen werden sie selbst durch ROS stark geschädigt (17). Sie setzen darüber hinaus Apoptose-induzierende Faktoren (AIF) frei (18). In der späten Phase stellen Kupffer-Zellen, sowie rekrutierte neutrophile Granulozyten die Hauptquelle der ROS dar (17).

Eine gestörte Mikrozirkulation führt auf der Ebene von Arteriolen, Kapillaren und Venolen bis hin zum Stagnieren des Blutflusses (*no-reflow phenomenon*), zu einer andauernden Ischämie des Leberparenchyms (19,20). Hierfür wird eine lokale Imbalance von Vasokonstriktoren (Endothelin-1) und Vasodilatoren (Stickstoffmonoxid, Kohlenstoffmonoxid) verantwortlich gemacht (21,22). Ebenso trägt die lokale Kompression von Kapillaren durch das intrazelluläre Ödem von Endothelzellen und der Verschluss von Gefäßen infolge vermehrter Adhäsion von Leukozyten, Thrombozyten und Fibrin, verursacht durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, zur ischämischen Schädigung bei (23).

Der IR-Schaden entsteht durch Energiemangel, Elektrolytverschiebung, Inflammation und eine gestörte Mikrozirkulation. Die ischämische Präkonditionierung ist ein Verfahren, welches die Ischämietoleranz und die Reperfusionstoleranz des Gewebes erhöht.

1.2 Ischämische Präkonditionierung

Die ischämische Präkonditionierung (IPC) wurde zuerst durch Murry *et al.* im Jahr 1986 beschrieben (24). Sie konnten zeigen, dass wiederholte, kurze Ischämie- und Reperfusionsphasen vor den Schäden einer darauffolgenden, längeren Ischämie schützen können. Am Myokard von Hunden konnte IPC die Infarktgröße um ca. 75% im Vergleich zu Kontrolltieren reduzieren. Seit der Erstbeschreibung des Phänomens der IPC wurde diese auf verschiedenste Organe übertragen und eine Vielzahl von molekularen Mechanismen beschrieben (7).

1.2.1 Allgemeine Auswirkungen

Die ischämische Präkonditionierung wurde unter anderem für den Darm, das Gehirn, die Leber, die Lunge, die Nieren und die Skelettmuskulatur gezeigt (7). Man unterscheidet Ischämietoleranz-steigernde von Reperfusionstoleranz-steigernden Effekten. Darüber hinaus lässt sich eine frühe, sofort einsetzende, von einer später einsetzenden und länger anhaltenden

Protektion unterscheiden (25). Die frühe Phase des protektiven Effektes setzt unmittelbar nach dem IPC-Stimulus ein, dauert ca. 2-3 h an und ist ausgeprägter als die späte Phase, welche 12-24 h nach der IPC einsetzt und bis zu 96 h anhält (7,26).

Die Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der IPC stammen aus Studien an unterschiedlichsten Spezies, Organen und Geweben mit unterschiedlichen Präkonditionierungsprotokollen sowie Studiendesigns. Aus diesem Grund muss der jeweilige Kontext der Ergebnisse berücksichtigt werden. Im Folgenden sind zunächst allgemeine, also nicht nur leberspezifische Effekte der ischämischen Präkonditionierung dargestellt.

1.2.2 Steigerung der Ischämietoleranz

Grundsätzlich wird die Ischämietoleranz durch einen reduzierten Zellmetabolismus, also einen reduzierten Energieverbrauch gesteigert (7) (Abb. 2). Zu den energieaufwändigsten Prozessen zählt die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials. Die IPC vermittelt eine Ischämietoleranz durch einen „*membrane arrest*“, welcher durch eine verminderte Leitfähigkeit der Zellmembran gekennzeichnet ist (Abb. 2). Dies reduziert die Aktivität der ATP verbrauchenden Na^+ - K^+ -ATPase (27) und konnte für ischämisch präkonditionierte Neuronen *in vitro* nachgewiesen werden (28). Der Verbrauch energiereicher Phosphate (ATP) wird durch die IPC insbesondere während der Initialphase einer Ischämie reduziert (29). Eine intrazelluläre Akkumulation von Na^+ - und H^+ - Ionen konnte durch ischämische Präkonditionierung von Hepatozyten *in vitro* reduziert werden (30). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Laktat im Rahmen einer Skelettmuskelschämie bei Schweinen und einer partiellen Leberischämie bei der Ratte nach IPC weniger akkumulierte als bei Kontrollen (31,32). Als potentieller Regulator wurde die Adenosin 5'-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) beschrieben, welche die Glykolyse und somit die Laktatproduktion inhibiert (33). Während der IPC fällt vermehrt Adenosin 5'-Monophosphat (AMP) an, welches die AMPK allosterisch aktiviert und somit die Glykolyse hemmt (34) (Abb. 2). Im Rahmen einer partiellen Leberischämie konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung der AMPK den protektiven Effekt der IPC aufhebt (35). Darüber hinaus konnte IPC-induziert eine erhöhte cAMP-Konzentration (cyclisches AMP) in Endothelzellen der Leber nachgewiesen werden (36). Diese führt durch cAMP-abhängige Proteinkinasen (z.B. Proteinkinase A) zu einer Phosphorylierung des Phosphofruktokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase Enzymkomplexes, der wiederum die Glykolyse hemmt (37) (Abb. 2).

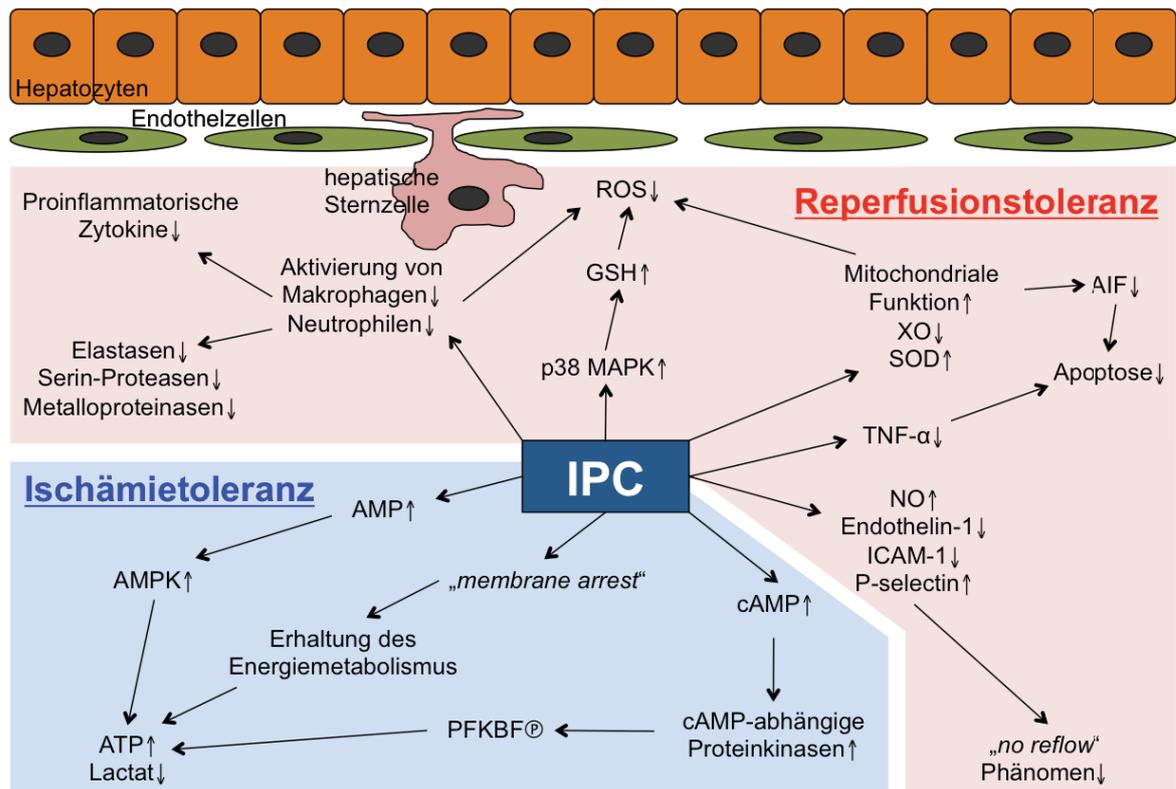


Abb. 2 **Auswirkungen der IPC modifiziert nach (38):** Potentielle Mechanismen, die am protektiven Effekt der IPC beteiligt sind. Blau unterlegt sind die Ischämietoleranz steigernden Mechanismen. Rot unterlegt sind die Reperfusionstoleranz steigernden Mechanismen. (IPC: Ischämische Präkonditionierung, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, GSH: Glutathion, p38 MAPK: p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen, XO: Xanthinoxidase, SOD: Superoxid-Dismutase, AIF: Apoptose induzierende Faktoren, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α , ICAM-1: Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, AMP: Adenosin 5'-Monophosphat, cAMP: Cyclisches Adenosin 5'-Monophosphat, PFKBF: Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase, ATP: Adenosintriphosphat, AMPK: Adenosin 5'-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase)

Die Steigerung der Ischämietoleranz wird unter anderem durch Regulation der Glykolyse und der Membranleitfähigkeit erreicht. Für die Reperfusionstoleranz ist die Beeinflussung des oxidativen Stresses, der Inflammation und der Mikrozirkulation entscheidend.

1.2.3 Steigerung der Reperfusionstoleranz

Die Reduktion des oxidativen Stresses ist ein wesentlicher Bestandteil der Steigerung der Reperfusionstoleranz. Eine Quelle von ROS während der Reperfusion ist die Xanthinoxidase (XO), ein Enzym des Purinstoffwechsels, welches Xanthin zu Harnsäure abbaut (4). Unter physiologischen Bedingungen liegt die XO zu ca. 90% als Xanthindehydrogenase (XDH) vor, welche Xanthin unter Entstehung von Nicotinamadenindinukleotid (NADH) zu Harnsäure abbaut. Während einer Ischämie wird die XDH durch Ca^{2+} -abhängige Proteasen in die XO überführt (39), welche Xanthin unter Entstehung eines Superoxid-Anions zu Harnsäure abbaut. Es konnte gezeigt werden, dass die IPC eine Umwandlung der XDH in die XO und

damit die Entstehung von ROS während der IR reduziert (40). In der Leber sind vor allem aktivierte Kupffer-Zellen und neutrophile Granulozyten die Quellen des oxidativen Stresses (41). Durch eine IPC kann sowohl die Aktivierung der Kupffer-Zellen, als auch die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen reduziert werden (42). Letzteres ist bedingt durch eine Verminderung des IR-induzierten Anstiegs der Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen wie z.B. Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und P-selectin (43,44), die letztlich zu einer Reduktion der kapillären Obliteration führt. Die Aktivierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) und die Aufrechterhaltung des intrazellulären Glutathion-Redoxsystems scheinen in der Leber am IPC-induzierten Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt zu sein (45). Ob der Adenosin_{A2}-Rezeptor ebenfalls beteiligt ist, wurde bislang nicht abschließend geklärt (45,46). Der AIF ist ein Auslöser des programmierten Zelltods und kommt im intermembranösen Raum der Mitochondrien vor. Es wurde im Rahmen einer Myokardischämie der Ratte gezeigt, dass IPC die IR-induzierte Freisetzung von AIF vermindert (47). Durch IPC lässt sich die postischämische Mikrozirkulation verbessern (48). So ist die Endothelfunktion während einer IR stark beeinträchtigt (49), Endothelin-1 wird vermehrt freigesetzt und führt zu einer Vasokonstriktion. NO wirkt vasodilatierend und wird vom Endothel während einer Ischämie vermindert freigesetzt. Durch IPC lässt sich dieser Effekt reduzieren (50).

IPC reduziert die Produktion und erhöht die Elimination von ROS. Die Mikrozirkulation wird verbessert und apoptotische Prozesse werden vermindert. Im Folgenden wird auf die leberspezifischen Effekte der IPC eingegangen.

1.2.4 IPC-Studien der Leber

Die protektiven Effekte der hepatischen IPC wurden bereits in verschiedenen experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen (6). Die Ergebnisse der hepatischen IPC hängen von der Schwere bzw. Dauer der Ischämie, dem Alter des Organismus bzw. dessen Leber, den Grunderkrankungen der Leber (*Steatosis hepatis*, Leberzirrhose, hepatozelluläres Karzinom etc.) und der Form der Ischämie (warme vs. kalte Ischämie) ab (6,51). Als Marker für den hepatozellulären Schaden werden in den meisten Studien die Transaminasen im Serum, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie die Gallenproduktion als Marker für die Entgiftungsleistung verwendet. Neben der IPC sind weitere Möglichkeiten beschrieben, die Leber vor einem IR-Schaden zu schützen, wie z.B. die pharmakologische Präkonditionierung (u.a. mit Allopurinol (52), Methylprednisolon (53,54), PGE₁ (55,56) und Vitamin E (57)) oder die ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC:

remote ischemic preconditioning) (6). Bei der RIPC induzieren kurze Episoden einer Ischämie in einem entfernten Organ oder Gewebe (z. B. an einer Extremität) eine Protektion in einem anderen Organ. Neuere Operationstechniken wie z. B. *Intermittent Portal Triad Clamping* scheinen bei kurzen IR-Zeiten (< 40 min) ähnlich effektiv wie eine IPC zu sein (58). Mit dem Verfahren der *Selective hepatic vascular exclusion* (SHVE) konnte kein signifikanter Nutzen der IPC in Bezug auf postoperative Leberfunktion, Morbidität und Mortalität festgestellt werden (59). Bei dieser Operationstechnik werden zusätzlich zum Pringle Manöver einzelne Lebervenen isoliert und okkludiert, um den Blutverlust durch retrograden Blutfluss über die *Vena cava inferior* zu reduzieren (58).

Eine Hepatoprotektion durch IPC konnte in experimentellen und klinischen Studien auf Ebene der Enzymfreisetzung und in Bezug auf die postoperative Leberfunktion nachgewiesen werden. Die molekularen Mechanismen, die zu dieser Hepatoprotektion führen, sind bislang nicht zufriedenstellend geklärt. Eine mögliche Herangehensweise ist die Analyse des Leberproteoms.

1.3 Proteomstudien zur IPC und zur Ischämie und Reperfusion der Leber

Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Organismus, einem bestimmten Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment vorhanden sind. Das Proteom ist ein hoch dynamisches System, welches einem ständigen Umsatz durch Neusynthese, Proteinabbau und Proteinmodifikation unterliegt. Es reagiert auf einen Stimulus, wie z.B. eine IR, und lässt somit Rückschlüsse auf dessen molekulare Auswirkungen zu. Vergleicht man das Proteom verschiedener Interventionsgruppen, kann anhand differentiell regulierter Proteine der unmittelbare Einfluss auf Proteinsynthese, -abbau oder -modifikation ermittelt werden.

Der hepatische IR-Schaden wurde erstmals 2006 mit einem proteomanalytischen Ansatz untersucht (60). In Biopsien von neun Lebertransplantaten wurden mittels Kombination aus 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectrometry*) 36 signifikant regulierte Proteine identifiziert. Diese konnten dem Energiemetabolismus, den Redoxsystemen, dem Lipidmetabolismus, dem Protein- und Aminosäuremetabolismus und den Chaperonen zugeordnet werden. In einer tierexperimentellen Studie zeigte das Proteom von Kupffer-Zellen nach einer IR eine vermehrte Expression von Proteinen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Calgranulin B, Complement C3, Myeloperoxidase) sowie von antioxidativen Proteinen

(Cu/Zn-Superoxiddismutase, Katalase) (61). Andere Proteomstudien zu hepatischer IR identifizierten neben Proteinen des Aminosäure- und Fettsäuremetabolismus sowie Strukturproteinen eine Herunterregulation von verschiedenen Chaperonen (62). Dies führte zur Anhäufung von ungefalteten Proteinen, auch bekannt als „*unfolded protein response*“ oder „*endoplasmic reticulum response*“ (63).

Eine der ersten Proteomstudien zu den Auswirkungen von hepatischer IPC wurde 2009 veröffentlicht (64). Hier konnten insgesamt 16 durch IPC regulierte Proteine identifiziert werden, wovon 11 am Zellmetabolismus beteiligt waren. Man vermutete, dass eine Ischämie und Reperfusion den Zellmetabolismus herunter reguliert und insbesondere die IPC-induzierte Regulation der ATP-Synthase 5 β zu einem Erhalt der ATP-Reserven führt.

Bisherige Proteom-Studien konnten eine IR-induzierte Regulation von Proteinen des Zellmetabolismus, von antioxidativen Proteinen und Proteinen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, identifizieren. Die IPC in Kombination mit IR hatte vor allem Einfluss auf den Zellmetabolismus. Posttranslationale Proteinmodifikationen (PTMs) wurden in diesen Proteom-Studien nur unzureichend berücksichtigt (65).

1.4 Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf das hepatische Phosphoproteom

In der Literatur sind etwa 300 verschiedene posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen beschrieben (66). Zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen zählen die proteolytische Prozessierung, Hydroxylierungen, Carboxylierungen, Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen, Acylierungen, Isoprenylierungen und die Bindung an Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker (67).

Unter den PTMs sind Phosphorylierungen unter anderem maßgeblich an zellulären Signalkaskaden und der Regulation von Enzymaktivitäten beteiligt (67). Durch reversible Bindung von Phosphatgruppen an Aminosäuren mit einer Hydroxylgruppe (Serin, Threonin und Tyrosin) entstehen Phosphoproteine. Kinasen und Phosphatasen können durch diese Modifikation die Aktivität einiger Phosphoproteine beeinflussen (68). Dass posttranslationale Phosphorylierungen auch bei der hepatischen IPC eine Rolle spielen, lassen IPC-Studien an anderen Organen vermuten (45,46).

Der Einfluss der hepatischen IR auf das Phosphoproteom wurde bislang erst in einer Studie im Rahmen von Lebertransplantationen untersucht (69). Mittels spezifischen Antikörpern wurden Phosphotyrosin-Proteine (pY-Proteine) immunpräzipitiert und anschließend im 1D-

Gel aufgetrennt. Nach 60-minütiger Ischämie konnten sieben pY-Proteine identifiziert werden. Nach weiteren 60 min Reperfusion wurden 37 pY-Proteine identifiziert. Hierbei wurde Nck-1 (Nicht-katalytische Region des Tyrosinkinase-Adapterproteins 1) detektiert, allerdings lediglich nach Beendigung der Ischämiephase. Die Autoren postulierten, dass Nck-1 an der IR-induzierten Aktin-Reorganisation beteiligt ist (69).

Die bestehenden Proteomstudien zur hepatischen IPC unterliegen wesentlichen Einschränkungen. Häufig wurde nur ein (End-)Zeitpunkt untersucht, der zeitliche Verlauf des hoch dynamischen Leberproteoms blieb unberücksichtigt (61,64). Außerdem wurde die IPC in Kombination mit IR (IPC-IR) angewandt, der alleinige Effekt der IPC blieb ebenfalls unberücksichtigt (64).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit einem globalen Phosphoproteomansatz neue Mechanismen der hepatischen IPC zu identifizieren und die Pathophysiologie des hepatischen IR-Schadens besser zu verstehen. Nach subzellulärer Fraktionierung der Leberproteine wurde das zytosolische Subproteom untersucht.

Es war Ziel dieser Arbeit, die folgenden Fragen zu beantworten:

- Welchen Einfluss hat die IPC unmittelbar nach Beendigung des IPC-Protokolls und im zeitlichen Verlauf (140 min nach Beginn des IPC-Protokolls) auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine der Leber?
- Welchen Einfluss hat die IPC in Kombination mit IR auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine der Leber?
- Welchen Einfluss hat die IR auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine der Leber?
- Welchen Einfluss hat die IR in Kombination mit IPC auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine der Leber?
- Welchen Einfluss hat die OP-Zeit auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine der Leber bei SHAM- und IPC-behandelten Tieren?

Da die Untersuchung der *Phosphoproteomics* komplex und bis dato durch Methodik und eine eingeschränkte Datenlage begrenzt ist, war die Weiterentwicklung der entsprechenden Methodik ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde der folgende methodische Ansatz gewählt. An der Rattenleber wurde eine warme, partielle Ischämie mit Reperfusion induziert und zwar mit oder ohne vorgeschaltete IPC. Zu zwei Untersuchungszeitpunkten, unmittelbar nach Beendigung des IPC-Protokolls und nach Beendigung der Reperfusion bzw. zu den entsprechenden Zeitpunkten in schein-operierten Kontrollen, wurde bei den entsprechenden Untersuchungsgruppen Lebergewebe zur Proteinanalytik entnommen. Mittels differentieller Zentrifugation wurden die Proteine subzellulär fraktioniert und die zytosolischen Proteine mit der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die sequentielle Färbung der Proteine mit der ProQ-Diamond-Phosphoprotein-Stain (ProQ-DPS) und einer hochsensitiven Coomassie-Färbung ermöglichte die Analyse differentieller Modifikation bzw. Expression. Die differentiell regulierten Proteine wurden mittels *Electrospray ionization* (ESI) Massenspektrometrie sowie mittels Orbitrap Massenspektrometrie, gekoppelt mit einer *Ultra high performance liquid chromatography* (UHPLC) identifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Lebergewebe

Das in der Dissertation beschriebene *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 Lebergewebeproben wurden bei -80°C gelagert. Meine Arbeit 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.

Das untersuchte Gewebe stammte aus den Tierversuchsvorhaben mit den Aktenzeichen: 8.87-50.10.34.09.017 und 87-51.04.2010.A011. In der vorliegenden Untersuchung führte ich die proteinanalytischen Arbeiten im Rahmen eines Freisemesters (SS 2011) durch. Verwendet wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von $300\text{ g} \pm 20\text{ g}$. Die Ratten stammten aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (Direktor Prof. Dr. M. Sager) des Universitätsklinikums Düsseldorf, sodass eine Quarantäne und eine Adaptationszeit entfielen.

2.1.1 Operation der Tiere

Das Tiermodell der warmen partiellen Leberischämie bei Wistar Ratten wurde im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie (Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt und bereits in früheren Studien angewandt (70–72). Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 60 mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) anästhesiert und mit einer Kanüle intratracheal intubiert. Zur Gabe von Elektrolytlösungen wurde die Schwanzvene punktiert. Um den arteriellen Blutdruck zu kontrollieren und kontinuierlich Pentobarbital zu geben, wurde eine *Arteria carotis communis* und *Vena jugularis interna* auf einer Seite durchtrennt und kanüliert. Es wurden Blutproben zur Blutgasanalyse und Elektrolytkontrolle entnommen. Die Tiere wurden so beatmet, dass physiologische CO_2 -Partialdrücke eingehalten wurden. Die Temperatur wurde rektal gemessen und während der gesamten Operation mittels Heizplatten konstant gehalten. Die Tiere wurden

median laparotomiert und ein Portalvenenast, sowie die dazugehörige Leberarterie mit einer atraumatischen Klemme komprimiert (partielle Leberischämie von ca. 70%). Nach dem Präkonditionierungsprotokoll (Abb. 3) wurden die Tiere den jeweiligen Interventionen unterzogen. Blut und Gewebe wurde zu den, durch rote Pfeile markierten Zeitpunkten, entnommen. Sowohl Lebergewebe als auch Serum wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Im Serum wurden die Transaminasen, ALT und AST, durch das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege) bestimmt.

2.1.2 Versuchsprotokoll

Um die Effekte der Ischämie und Reperfusion, sowie der ischämischen Präkonditionierung mit unbehandelten Kontrollgruppen (SHAM) vergleichen zu können, wurden insgesamt 36 Tiere in sechs Interventionsgruppen randomisiert (Abb. 3).

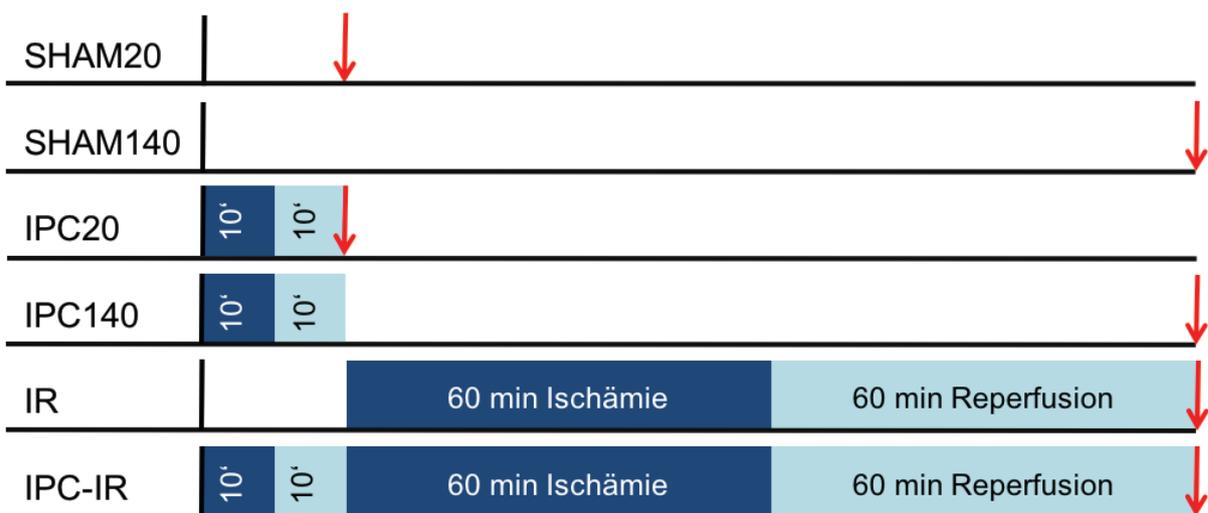


Abb. 3 **Versuchsprotokoll:** Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der Blut- und Gewebeentnahme. (SHAM20: scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt t = 20 min, SHAM140: scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt t = 140 min, IPC20: Tiere mit 10 min Ischämie und 10 min Reperfusion zum Zeitpunkt t = 20 min, IPC140: Tiere mit 10 min Ischämie und 10 min Reperfusion zum Zeitpunkt t = 140 min, IR: Tiere mit 60 min Ischämie und 60 min Reperfusion zum Zeitpunkt t = 140 min, IPC-IR: Tiere mit IPC gefolgt von IR zum Zeitpunkt t = 140 min), n = 6 Tiere/Gruppe.

Die SHAM-Tiere erhielten nach Präparation der Leber keine weitere Intervention. Die IPC bestand aus zehn Minuten partieller Ischämie, gefolgt von zehn Minuten Reperfusion. Die IR bestand aus 60 min Ischämie und 60 min Reperfusion. Die IPC-IR-Gruppe erhielt IPC gefolgt von IR. Die roten Pfeile in Abb. 3 markieren die Zeitpunkte zu denen Lebergewebe und Blutproben zur Gewinnung von Serum entnommen wurden.

2.2 Chemikalien und Geräte

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (*p. a.*), sowie ultrareines Wasser aus einer Millipore Anlage (Milli-Q, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen, falls nicht anders gekennzeichnet.

2.3 Isolierung der Proteine

Um die Leberproteine mittels Gelelektrophorese aufzutrennen, wurde das Gewebe zunächst mechanisch homogenisiert und mittels Lysepuffer lysiert. In einem zweiten Schritt wurde das Zellysate durch differentielle Zentrifugation in subzelluläre Fraktionen aufgetrennt.

Tabelle 1 Puffer und Lösungen zur Isolierung der Proteine

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	200 µl Proteaseinhibitoren: 1 mg Aprotinin, 1 mg Leupeptin, 1 mg Pepstatin <i>ad</i> 10 ml 0,5 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,4) 10 ml Phosphataseinhibitoren: 5 mM Trizma Base (pH 7-9), 50 mM NaF, 2 mM Na ₃ VO ₄ , 2 mM EGTA 7,7mg DTT
Anodenpuffer	Schwach: Methanol (20%, v/v), 25 mM Tris-HCl Stark: Methanol (20%, v/v) und 0,3 M Tris-HCl
Kathodenpuffer	Methanol (20%, v/v) und 40 mM Aminocaprinsäure
Blocking Solution	5%ige: 50 g <i>Dried skimmed milk</i> , 1000 ml MilliQ-Wasser, 5 Tabletten Tris-buffered Saline, 1 ml Tween 1%ige: 10 g <i>Dried skimmed milk</i> , 1000 ml MilliQ-Wasser, 5 Tabletten Tris-buffered Saline, 1 ml Tween
TBS-T	2000 ml MilliQ-Wasser, 10 Tabletten <i>Tris-buffered-Saline</i> , 2 ml Tween

Lösung 1 Reagenz A: 10 g Na_2CO_3 *ad* 500 ml 0,1 M NaOH-Lösung
Reagenz B: 2 g KNa-Tartrat *ad* 100 ml MilliQ-Wasser
Reagenz C: 1 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ *ad* 100 ml MilliQ-Wasser

Lösung 2 500 μl Folin-Reagenz, 500 μl MilliQ-Wasser

DTT: Dithiothreitol, TBS-T: *Tris-buffered-Saline* mit Tween, EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, NaF: Natriumfluorid, Na_3VO_4 : Natriumorthovanadat

2.3.1 Homogenisierung

Für die mechanische Homogenisierung des Lebergewebes wurden gefrorene Leberstückchen von ca. 250 mg - 350 mg abgewogen. Diese wurden in flüssigen Stickstoff überführt und zwischen zwei in flüssigem Stickstoff gekühlten Metallblöcken (Dick, Deizisau, Deutschland) mit vier bis sechs Hammerschlägen pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde in 3 ml Lysepuffer (Tabelle 1) gegeben und bei 4 °C mit einem Homogenisator (IKA, Staufen, Deutschland) in zwei Stufen mit unterschiedlichen Scherkräften für jeweils dreimal 15 s homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurden drei technische Replikate erstellt. Hierfür wurde das Zelllysate des Lebergewebes von einem Versuchstier zu jeweils 1 ml auf drei Reagenzgefäße (Eppendorf, Deutschland, LoBind® *tube*) verteilt. Nach der Homogenisierung wurde jedes technische Replikat separat weiterbehandelt. Die Zelllysate wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Subzelluläre Fraktionierung

Um einzelne Zellkompartimente getrennt analysieren zu können, wurde mittels differentieller Zentrifugation eine subzelluläre Fraktionierung vorgenommen. Dadurch reduziert sich die Menge unterschiedlicher Proteine in einer Probe und gleichzeitig erhöht sich die Sensitivität für kleine Veränderungen des Subproteoms. Folgende Fraktionen wurden aufgetrennt: 1) Zytoplasmatische Fraktion (Cyt) 2) Mitochondriale Fraktion (Mi) 3) Nukleäre Fraktion (Nu) 4) Membranen-fraktion (Mem). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss auf das Phosphoproteom an der zytoplasmatischen Fraktion analysiert. Der Einfluss auf die Proteinexpression der mitochondrialen Fraktion wurde gesondert durch T. Strahl (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) untersucht. Die Expression von zytoplasmatischen Proteinen wurde darüber hinaus an zwei sich überlappenden pH-Bereichen durch S. Weidhaas (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) untersucht. Die nukleäre und Membranenfraktion wurden bislang nicht untersucht.

Die Zentrifugationsschritte mit maximal 16000 g wurden einer Mikro 220R Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland), sowie LoBind Reagenzgefäße (Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte mit 144000 g wurden mit einer Optima™ Ultrazentrifuge (TLA-100.3 fixed Angle Rotor, Beckmann Culter GmbH, Krefeld, Deutschland), sowie Ultrazentrifugen Reagenzgefäßen (Beckmann, Deutschland) durchgeführt. Das Leberhomogenat wurde langsam, über 60 min aufgetaut und bei 4 °C nach dem Fraktionierungsprotokoll in Abb. 4 zentrifugiert.

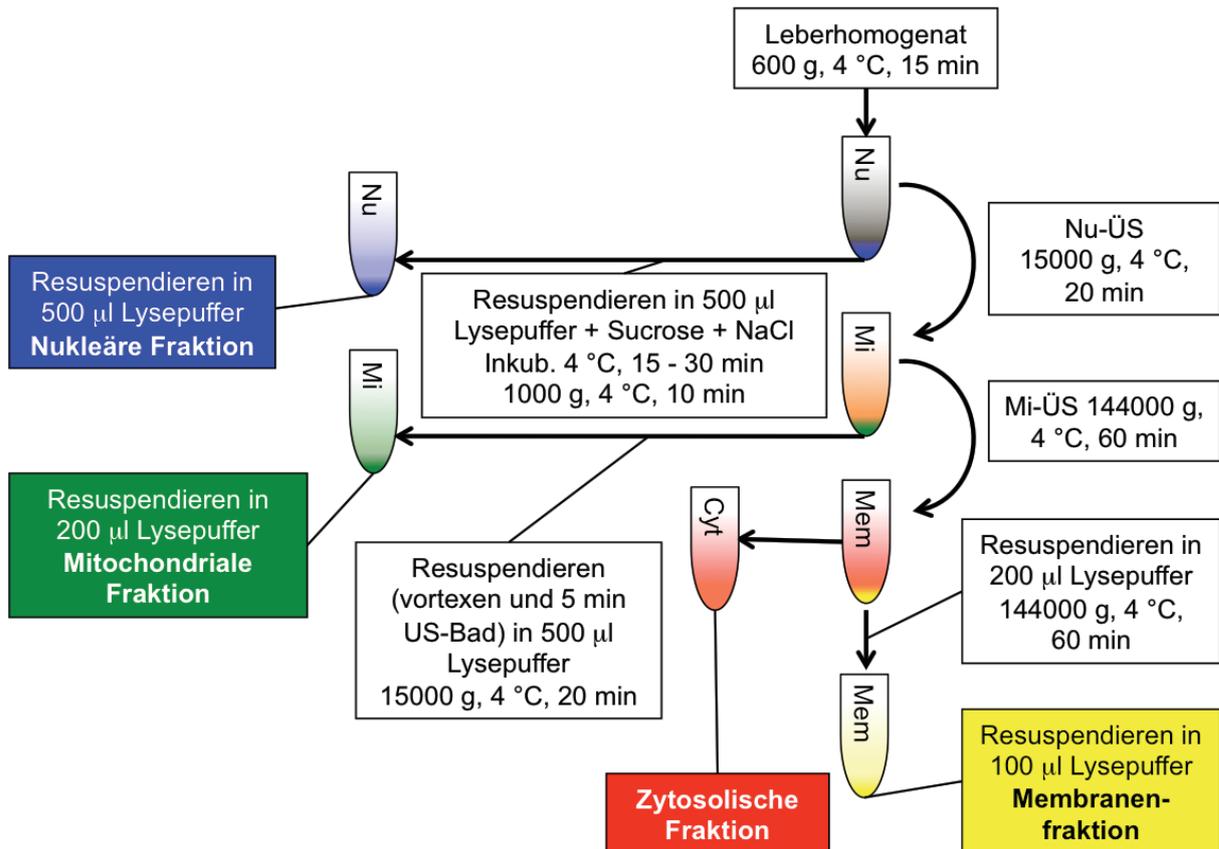


Abb. 4 **Fraktionierungsprotokoll:** Die subzellulären Fraktionen wurden durch differentielle Zentrifugation gewonnen. Nucleäre Fraktion (Nu), mitochondriale Fraktion (Mi), zytosolische Fraktion (Cyt), Membranfraktion (Mem). (ÜS: Überstand, US-Bad: Ultraschallbad)

Nach Abpipettieren der Überstände (ÜS) und Zugabe entsprechender Lysepuffer wurden die Pellets durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Fraktionen wurden bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.3.3 Western blot Analyse

Um die Anreicherung der subzellulären Fraktionen zu überprüfen, wurden Western blots gegen fraktionsspezifische Proteine durchgeführt (Tabelle 2). Dieser Nachweis wurde exemplarisch, an einer Probe erbracht und nicht nach jeder weiteren Fraktionierung wiederholt. Drei von vier

Western blots wurden von T. Strahl (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt und sind an dieser Stelle der Vollständigkeit halber erwähnt.

Tabelle 2 Antikörper gegen fraktionsspezifische Proteine

Fraktion	Protein	Antikörper	Hersteller
Cyt	GAPDH	Anti-GAPDH (Maus), 1:60000 verdünnt mit Blocking Solution (1%)	Abcam, #ab8245
Nu	Lamin B	Anti-Lamin B (Ziege), 1:10000 verdünnt mit Blocking Solution (1%)	Santa Cruz, #sc-6217
Mem	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Maus), 1:5000 verdünnt mit Blocking Solution (1%)	Abcam, #7671
Mi	Prohibitin	Anti-Prohibitin (Kaninchen), 1:10000 verdünnt mit Blocking Solution (1%)	Abcam, #ab2996

Cyt: Zytosol, Nu: Nukleus, Mem: Membran, Mi: Mitochondrium, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

Die Proteine jeder Fraktion wurden mittels 1D-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.5 Eindimensionale Gelelektrophorese (1D-Gelelektrophorese)). Hierfür wurden 10 µg Protein jeder Fraktion, sowie 10 µg Protein des Gesamtzelllysates und 2 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, München, Deutschland) aufgetrennt. Für den Blot wurden pro Gel jeweils 16 Filterpapiere (7,5 cm x 8,5 cm) sowie eine Polyvinylidenfluorid-Membran (8 cm x 9 cm) (PVDF-Membran) zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 30 s in Methanol und danach in schwachem Anodenpuffer (Tabelle 1) getränkt. Die Blot-Kammer, Multiphor II (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wurde wie folgt zusammengesetzt: 1) Kathode, 2) Acht Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt, 3) Gel, 4) PVDF-Membran in schwachem Anodenpuffer getränkt, 5) Vier Filterpapiere in schwachem Anodenpuffer getränkt, 6) Vier Filterpapiere in starkem Anodenpuffer getränkt und 7) Anode.

Es wurde für 2 h mit einem konstanten Strom von 204 mA (Stromdichte: 0,8 mA/cm²) geblottet. Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran mit einer Pinzette aus der Blot-Kammer genommen, in eine Färbeschale gelegt und für 2 h mit 25 ml 5%iger *Blocking Solution* bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Der Antikörper wurde mit 1%iger *Blocking Solution* nach den Angaben des Herstellers (Tabelle 2) verdünnt und die PVDF-Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Kippschüttler in 5 ml

Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die PVDF-Membran dreimal 10 min in 100 ml TBS-T auf einem Kippschüttler bei RT gewaschen, um sie dann mit einem zweiten, Peroxidase-gebundenen Antikörper (Tabelle 3) zu inkubieren.

Tabelle 3 Peroxidasegekoppelte Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti- <i>Mouse</i> -IgG, 1:10000 verdünnt mit Blocking Solution (1%)	Jackson/Dianova #115-035-1003
Anti- <i>Goat</i> -IgG, 1:10000 verdünnt mit Blocking Solution (1%)	Jackson/Dianova #705-035-003
Anti- <i>Rabbit</i> -IgG, 1:10000 verdünnt mit Blocking Solution (1%)	Jackson/Dianova #711-035-152

Nach zweistündiger Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die PVDF-Membran dreimal für 10 min auf einem Kippschüttler bei RT in 100 ml TBS-T gewaschen. Um die Peroxidase-reaktion zu starten, wurde die Membran mit 2 ml *Enhanced Chemoluminescence Reagent* (ECL-Reagenz: 1 ml Reagenz A mit 1 ml Reagenz B) für 2 min inkubiert. Mit einer Kamera (CoolSNAP HQ², Photometrics, Tucson, Arizona, USA) und der Gel Pro Analyzer Software (MediaCybernetics Inc., Bethesda, Maryland, USA) wurde die Chemolumineszenz detektiert. Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die PVDF-Membran, wurde diese anschließend mit Ponceau-S gefärbt.

2.3.4 Proteinbestimmung

Um bei der eindimensionalen und zweidimensionalen Gelelektrophorese von den einzelnen Proben jeweils die gleiche Menge Protein auftragen zu können, war es notwendig, die Proteinkonzentrationen der subzellulären Fraktionen zu bestimmen. Hierzu wurde das Verfahren nach Lowry angewandt (73). Bei bekannter Proteinkonzentration konnte die gewünschte Proteinmenge durch eine Proteinfällung mit TCA und Aceton gewonnen werden.

Für die Proteinbestimmung wurden Reagenz A, Reagenz B und Reagenz C angesetzt und im Kühlschrank gelagert (Tabelle 1). Vor jeder Messung wurden daraus die Lösung 1 und die Lösung 2 hergestellt. Lösung 1 wurde aus den Reagenzien A, B, C im Verhältnis 100:1:1 gemischt. Es wurden 500 µl Lösung 1 pro Probe benötigt. Es wurden 50 µl Lösung 2 pro Probe benötigt (Tabelle 1).

Als Eichstandard wurden 20 mg Rinder Serumalbumin (BSA) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst ($c = 200 \mu\text{g/ml}$), zu 2 ml aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor jeder Messung wurde eine Standardreihe aus BSA und MilliQ-Wasser von jeweils 500 μl angelegt ($c_1 = 0 \mu\text{g/ml}$, $c_2 = 12,5 \mu\text{g/ml}$, $c_3 = 25 \mu\text{g/ml}$, $c_4 = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_5 = 100 \mu\text{g/ml}$, $c_6 = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_7 = 200 \mu\text{g/ml}$). Jede zu messende Probe wurde zunächst 1:100 mit MilliQ-Wasser verdünnt. 500 μl Lösung 1 wurden mit 100 μl verdünnter Probe bzw. Eichstandard gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 50 μl Lösung 2 dazugegeben, gemischt und mindestens 0,5 h bei RT inkubiert. Zuletzt wurde aus jeder Probe bzw. jedem Eichstandard zweimal 200 μl in eine *96-Well* Platte pipettiert und die Extinktion bei 750 nm an einem Synergy 2 *Plate reader* (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen.

2.3.5 TCA/Aceton- Proteinfällung

Um die Proteine von anderen Zellbestandteilen, wie z.B. DNS, RNS, Lipiden und Salzen zu trennen, wurde eine Proteinfällung durchgeführt. Es wurden jeweils 150 μg Protein, gelöst in 100 μl Lysepuffer, gefällt. Zu jeder Probe wurden 800 μl Aceton (80%, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$) gegeben, gemischt und zusätzlich 100 μl Trichloressigsäure (TCA, 100%, RT) (Mischungsverhältnis von Probe/TCA/Aceton von 1+1+8). Der Ansatz wurde gemischt und über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die gefällten Proteine wurden in der vorgekühlten ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) Mikro 220R Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) bei 16000 g für 30 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde zweimal mit Aceton (80%, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$) bei 16000 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für ca. 15 min - 30 min bei RT an der Luft getrocknet.

2.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese)

Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (horizontal) und nach ihrem Molekulargewicht (vertikal) aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurden Elektrophoresekammern von Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Es wurden Polyacrylamid-Minigele (PAA) von 83 mm x 65 mm x 1 mm Größe verwendet und 150 μg Protein pro Gel aufgetrennt.

Tabelle 4 Puffer und Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
IEF-Puffer	7 M Urea, 2 M Thiourea, 2% (w/v) CHAPS, Spatelspitze Bromphenol blau, 40 mM DTT, 2% (v/v) Ampholyte (<i>IPG-Buffer 3-10</i> , Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland)
Equilibrierungspuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 2% (w/v) SDS, 6 M Urea, 60 ml Glycerol, eine Spatelspitze Bromphenolblau <i>ad</i> 200 ml MilliQ-Wasser
Agaroselösung	1,5 g Agarose, eine Spatelspitze Bromphenolblau <i>ad</i> 300 ml MilliQ-Wasser
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 1% (w/v) SDS <i>ad</i> 1000 ml MilliQ-Wasser
Fixiererlösung	5% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol

IEF-Puffer: Isoelektrische Fokussierung-Puffer, SDS: Natriumdodecylsulfat, *IPG*: *Immobilised pH gradient*, DTT: Dithiothreitol

2.4.1 Resuspendierung der Proteinpellets

Die Proteinpellets wurden in 125 μ l IEF-Puffer (Isoelektrische Fokussierung-Puffer, Tabelle 4) resuspendiert. Das DTT und die Ampholyte wurden erst unmittelbar vor der Resuspendierung dazu gegeben. Das Gemisch wurde kurz gevortext, 5 min bei RT in ein Ultraschallbad (Sonorex Super RK100SH, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) gestellt und anschließend für ca. 1-2 h auf einem Schüttler (VV3, VWR, Darmstadt, Deutschland) bei RT resuspendiert.

2.4.2 Isoelektrische Fokussierung

Um die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufzutrennen, wurden 7 cm lange PAA-*DryStrips* mit einem immobilisierten, nicht linearen pH-Gradienten (*immobilised pH gradient-IPG*) von pH 3-10 (Immobiline™ *DryStrip* pH 3-10, 7 cm, GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Diese wurden zunächst in einem *Rehydration Tray* (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) über Nacht mit dem IEF-Puffer-Proteingemisch rehydriert. Dazu wurde die Probe in das *Rehydration Tray* pipettiert, die Folie von dem IPG-Strip entfernt und dieser mit der Gelseite nach unten auf die Probe gelegt. Luftblasen unter dem

Streifen wurden durch vorsichtiges Anheben und Senken des Streifens vermieden. Damit die Probe nicht verdunstete, wurden 1,5 ml *Cover Fluid (PlusOne Dry Strip Cover Fluid*, GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden) über den Streifen pipettiert. Nach der Rehydrierung wurden die Streifen mit der Gelseite nach oben in das *Tray* des OFFGEL *Fractionators* (Agilent 3100 OFFGEL *Fractionator*, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) gelegt und mit 2 ml *Cover Fluid* bedeckt. Danach wurden *Paperwicks (Electrode Wicks*, Bio-Rad, München, Deutschland) mit destilliertem Wasser (nicht deionisiert) befeuchtet und auf die Enden der IPG-Strips gelegt. Eine Hälfte eines *Paperwicks* hatte Kontakt mit der Gelmatrix und auf die andere Hälfte wurde die Elektrode des OFFGEL *Fractionators* platziert. Die Fokussierung lief in vier Schritten ab. Zuerst wurde eine Spannung von 300 V über 3 h gehalten, im zweiten Schritt wurde die Spannung linear über ½ h auf 1000 V erhöht, im dritten Schritt wurde die Spannung innerhalb von 1,5 h auf 5000 V erhöht und schließlich auf 5000 V für 1-3 h gehalten bis entweder 10 kVh oder eine Gesamtdauer von 8 h erreicht wurden. Die Stromstärke eines IPG-Strips war zu jedem Schritt auf maximal 50 µA und die Leistung auf maximal 250 mW begrenzt. Nach Erreichen von 10 kVh oder 8 h wurde eine „Hold-Spannung“ von 500 V eingestellt. Nach der Fokussierung wurden die IPG-Strips mit einer Pinzette aus dem *Tray* genommen, die überschüssige *Cover Fluid* auf ein Filterpapier abgetropft und der IPG-Strip bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Polyacrylamid-Gele (PAA)

Für die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht wurden Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamid Gele mit einem PAA-Anteil von 11% verwendet. Diese wurden in vertikalen Gießständen (Bio-Rad, München, Deutschland) zwischen zwei Glasscheiben mit 1 mm dicken *Spacern* gegossen. Zur Herstellung von 4 PAA-Trenngelen wurden 10,95 ml 30%iges Polyacrylamid, 11,25 ml MilliQ-Wasser, 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 300 µl SDS (10%, w/v) gemischt. Anschließend wurden 30 µl Temed und 150 µl Ammoniumpersulfat (APS, 10%, w/v) hinzugegeben. Temed und APS dienten als Katalysator bzw. Polymerisationsinitiator. Zum Auflegen des IPG-Strips wurden 4 - 6 mm zur Oberkante der Deckplatte freigelassen. Um die obere Gelkante glatt zu ziehen, wurden 100 µl Isopropanol auf das flüssige PAA pipettiert. Nach 15 min - 20 min waren die Gele soweit polymerisiert, dass sie in feuchten Zellstoff verpackt und über Nacht im Kühlschrank gelagert werden konnten (Nachpolymerisation).

2.4.4 Auftrennung nach Molekulargewicht

Für die zweite Dimension wurden die IPG-Strips zunächst equilibriert. Hierbei werden Proteine denaturiert, Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (DTT) aufgebrochen und mit Iodacetamid (IAA) alkyliert, sowie Eigenladungen der Proteine mit SDS überdeckt. Der Equilibrierungspuffer (Tabelle 4) wurde unter ständigem Rühren in einem beheizten Reaktionsgefäß (90 °C) hergestellt und zu 20 ml aliquotiert. DTT und IAA wurden erst kurz vor der Equilibrierung dazu gegeben. Im ersten Schritt wurden die IPG-Strips für 15 min in 2,5 ml Equilibrierungspuffer mit 1% (w/v) DTT auf einem Kippschüttler geschwenkt (Duomax 1030, Heidolph Instruments, Kelheim, Deutschland). Im zweiten Schritt wurden die Strips für weitere 15 min in 2,5 ml Equilibrierungspuffer mit 2,5% (w/v) IAA geschwenkt.

Nach der Equilibrierung wurden die PAA-Gele in die Gelkammern eingesetzt und die Molekulargewichtsmarker vorbereitet. Es wurden auf jedem Gel zwei Molekulargewichtsmarker verwendet. *Precision Plus Protein all blue* (Bio-Rad, München, Deutschland), der besonders im Molekulargewichtsbereich von 250 kDa bis 75 kDa gut differenzierte und *Peppermint Stick™ Phosphoprotein molecular weight standards* (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), der zwei phosphorylierte Proteine (Ovalbumin und β -Casein) als Positivkontrolle für die Phosphatfärbung enthielt.

Der IPG-Strip und die Marker wurden zwischen den Glasplatten, über dem PAA-Gel in zuvor erhitzter (5 min, 95 °C) Agaroselösung eingebettet. Die Agaroselösung wurde unter ständigem Rühren, in einem auf 100 °C erhitzten Reaktionsgefäß hergestellt (Tabelle 4), zu 2 ml aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Die Reihenfolge von Molekulargewichtsmarkern und IPG-Strip war: Precision plus, +IPG-Strip-, Peppermint Stick™. Die Gelkammern wurden anschließend mit SDS-Laufpuffer befüllt (Tabelle 4). Um die Proteine bei möglichst hoher Spannung, ohne Überwärmung der Gele, laufen zu lassen, wurden die Gelkammern mit Eis gekühlt. Die Proteine wurden mit einer Spannung von 50 V über 30 min einlaufen gelassen. Anschließend wurde eine Spannung von 150 V solange gehalten, bis die Bromphenolblau-Lauffront das Gel gerade verlassen hatte (nach ca. 70 min). Die Gele wurden mit 100 ml Fixiererlösung (Tabelle 4) für 30 min auf einem Kippschüttler fixiert und anschließend in 100 ml Fixiererlösung gelagert.

2.5 Eindimensionale Gelelektrophorese (1D-Gelelektrophorese)

Für verschiedene Versuchsreihen wurde neben der 2D-Gelelektrophorese auch die 1D-Gelelektrophorese benötigt. Hierbei werden die Proteine nach dem Molekulargewicht

aufgetrennt. Für die 1D-Gelelektrophorese wurde ebenfalls ein 11%iges Trenngel verwendet. Ein 5,1%iges Sammelgel (Tabelle 5) wurde über das Trenngel geschichtet und ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Ladepuffer (Tabelle 5) gemischt und vor Befüllen der Geltaschen für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden mit einer Spannung von 50 V für 30 min einlaufen gelassen und danach auf einer Spannung von 120 V gehalten bis die Bromphenolblau-Lauffront das Gel verlassen hatte. Danach wurden die Gele fixiert.

Tabelle 5 Puffer und Lösungen für die 1D-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
Sammelgel	2,55 ml PAA (30%), 10,5 ml MilliQ-Wasser, 1,5 ml 1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 150 µl SDS (10% w/v), 30 µl Temed, 150 µl APS (10%, w/v)
Ladepuffer	3,9 ml MilliQ-Wasser, 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8 ml Glycerol, 1,6 ml SDS (10% w/v), 0,4 ml 2-Mercaptoethanol, 0,4 ml Bromphenolblau (1%, w/v)

PAA: Polyacrylamid, SDS: Natriumdodecylsulfat, Temed: Tetramethylethylendiamin, APS: Ammoniumpersulfat

2.6 Proteinfärbung

Um zum einen das Phosphoproteom und zum anderen das gesamte Proteom analysieren zu können, wurden die Gele sequenziell mit zwei Farbstoffen gefärbt. Zuerst wurden die Gele mit ProQ® *Diamond Phosphoprotein Gel Stain* (ProQ-DPS) (Molecular Probes™, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Ex/Em bei ~555 nm/~580 nm), welcher unabhängig von der phosphorylierten Aminosäure bzw. Aminosäuresequenz, spezifisch an Phosphatgruppen bindet. Um alle Proteine zu färben wurde eine kolloidale Coomassie Färbung verwendet (74,75).

Tabelle 6 Puffer und Lösungen für die Proteinfärbung

Puffer	Zusammensetzung
Destain	400 ml Acetonitril, 100 ml 1 M Natriumacetat (pH 4) <i>ad</i> 1500 ml
Solution ProQ	MilliQ-Wasser

AP-Puffer	121,11 mg Tris-Base, 4,07 mg MgCl ₂ ad 20 ml MilliQ-Wasser, mit HCl auf pH 9,8 titriert
Coomassie Färbung	100 g Aluminiumsulfat-18-Hydrat, 240 ml Ethanol (80%, v/v), 0,4 g Coomassie Brilliant Blue-G250, 47 ml Ortho-Phosphorsäure (85%, v/v), 1700 ml MilliQ-Wasser
Entfärber	240 ml Ethanol (80%, v/v), 47 ml Ortho-Phosphorsäure (85%, v/v) ad 2000 ml MilliQ-Wasser

AP: Alkalische Phosphatase

2.6.1 ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain (ProQ-DPS)

Nach Fixierung der Gele wurden diese zunächst dreimal 10 min mit 100 ml MilliQ-Wasser auf dem Kippschüttler gewaschen. Die Färbeschritte fanden in einem Dunkelraum statt. Gefärbt wurde für 1,5 h mit 40 ml einer 1:1 verdünnten ProQ-DPS-Lösung (20 ml MilliQ-Wasser, 20 ml ProQ-DPS). Danach wurde dreimal 30 min mit 100 ml *Destain Solution ProQ* (Tabelle 6) entfärbt. Nach den Entfärbeschritten wurden die Gele zweimal 5 min in 100 ml MilliQ-Wasser gewaschen und anschließend am Laserscanner Typhoon 8600 (GE Healthcare Life Science, München, Deutschland) (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und Typhoon 9400 (GE Healthcare Life Science, München, Deutschland) (Deutsches Diabetes Zentrums, Auf'm Hennekamp 65, 40225 Düsseldorf) gescannt. An beiden Scannern wurden gleiche Scanparameter (Acquisition Mode: *Fluorescence*, Laser: *Green* 532 nm, Filter: Gen Purp 560LP, *Photo multiplier tube*: 500 V, Auflösung: 100 micron, Focal Plane: Platen/+ 3 mm) verwendet. Auf dem Typhoon 9400 wurden die Gele auf einer 3 mm dicken, nicht fluoreszierenden Glasscheibe gescannt, was in den Scanparametern berücksichtigt wurde.

2.6.2 ProQ-DPS Chargentest

Um die ProQ-DPS in Bezug auf Farbeintensität und Spezifität zu überprüfen, wurde ein Chargentest etabliert. Bei diesem wurde eine festgelegte Menge phosphorylierter Proteine mittels 1D-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit ProQ-DPS gefärbt und die Intensität quantitativ ausgewertet. Zudem wurden die Proteine in verschiedenen Konzentrationen aufgetrennt, um eine Linearität zwischen Phosphoproteinmenge und Intensität der Färbung sicher zu stellen. Es wurden jeweils 10 mg BSA (keine Phosphatgruppen), α -Casein (9 Phosphatgruppen), β -Casein

(5 Phosphatgruppen) und Ovalbumin (2 Phosphatgruppen) in 10 ml MilliQ-Wasser gelöst und zu 500 µl aliquotiert. Für jeden Chargentest wurde ein Aliquot im Verhältnis 1:10 mit MilliQ-Wasser verdünnt. Daraus ergab sich eine Ausgangskonzentration von $c = 100 \mu\text{g Protein/ml}$. Anschließend wurde hieraus eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:1024 erstellt. Hiervon wurden jeweils 16 µl in einem 1D-Gel aufgetrennt. Neben der Verdünnungsreihe wurden 2 µl *Peppermint Stick*TM Molekulargewichtsmarker aufgetrennt (Reihenfolge: *Peppermint Stick*TM, Verdünnung 1:1 bis 1:1024). Um Proteinbanden quantitativ vergleichen zu können, wurde die ImageQuant Software (Version 5.2, Molecular Dynamics 1999) verwendet. Es wurde jeweils ein Rechteck um die zu quantifizierende Bande gelegt und ein sog. *Volume report* dieses Rechteckes erstellt. Das errechnete Volumen (Graustufe x Fläche) entsprach der jeweiligen Intensität der Bande. Der *Volume report* wurde in eine Excel-Tabelle exportiert und graphisch dargestellt (Abb. 8).

2.6.3 Alkalische Dephosphorylierung

Um die Spezifität der ProQ-DPS beurteilen zu können, wurden die phosphorylierten Proteine des Chargentest-Standards mit Alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert (*Intestinal-type alkaline phosphatase, Bovine*, Sigma Aldrich). Die verwendete AP hatte laut Hersteller eine Aktivität von 2 Units/µl und wurde bei -80 °C gelagert. Das Proteingemisch wurde in AP-Puffer (Tabelle 6) gelöst und danach mit der AP bei 37 °C inkubiert. Verwendet wurden 5-15 Units AP in einem Ansatz von 1 ml AP-Puffer mit 100 µg Proteingemisch für jeweils 0 h, 0,5 h, 1 h und 2 h. Um die AP nach der Inkubationszeit zu inaktivieren, wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert und bis zum Befüllen der Gelkammern auf Eis gelagert.

2.6.4 Kolloidale Coomassie Färbung

Nach Färbung mit der ProQ-DPS folgte eine Färbung aller Proteine mit einer kolloidalen Coomassie Färbung (74,75). Die Gele wurden über Nacht in 100 ml Coomassie Färbung gefärbt (Tabelle 6). Nach der Färbung wurden die Gele für 3 - 4 h in 100 ml Entfärber (Tabelle 6) entfärbt. Mit einem Flachbett Scanner (Image Scanner, Amersham pharmacia, Biotech) und der LabScan Software (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wurden die Gele eingescannt. Die Gelbilder wurden in Graustufen mit einer Auflösung von 1134 x 942 Pixeln im TIF-Format (*Tagged Image File Format*) gespeichert. Um die Gele nach dem Scan lagerungsfähig zu machen, wurden sie für 30 s in Essigsäure (10%, v/v) getränkt, mit einem Folienschweißgerät (Folio, Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland) eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

2.7 Vergleichende Analyse der 2D-Gele

Um differentiell modifizierte und differentiell exprimierte Proteinspots zu detektieren wurde die Delta 2D Software (Version 4.3) von Decodon (Decodon GmbH, Greifswald, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden mit der Software jeweils drei 2D-Projekte mit den Coomassiegefärbten Bildern (differentielle Expression, technische Replikate: Replikat A, Replikat B, Replikat C) und drei 2D-Projekte mit ProQ-DPS-gefärbten Bildern (differentielle Modifikation, technische Replikate: Replikat A, Replikat B, Replikat C) angelegt. Der Grund für die Aufteilung in insgesamt sechs Einzelprojekte lag in der Auslastung des Arbeitsspeichers und der Rechenleistung des Computers (Windows XP, 32-bit System). Innerhalb eines Projektes wurden folgende sechs Gruppen mit jeweils sechs biologischen Replikaten angelegt: 1) SHAM20 2) SHAM140 3) IPC20 4) IPC140 5) IR 6) IPC-IR.

Innerhalb einer Gruppe wurden alle Gelbilder auf ein repräsentatives Gelbild der Gruppe „*gewarped*“ (Abb. 5). Das bedeutet, dass manuell Vektoren zwischen korrespondierenden Proteinspots gelegt wurden (ca. 60-100 Vektoren pro Bild), mit Hilfe derer die Software eine Überlagerung der Bilder erzeugte („*warping*“). Um Vergleiche zwischen den verschiedenen Gruppen anzustellen, wurden sechs repräsentative Gruppenbilder übereinander gelagert. Es wurde ein sogenanntes „*Fusion-Image*“ erstellt (Abb. 5). Für das Fusionsbild wurden die repräsentativen Gruppenbilder zu einem Fusionsbild vereint, auf dem alle Proteinspots der verschiedenen Gruppen vertreten waren. Das Fusionsbild wurde gegen die repräsentativen Gruppenbilder *gewarped* (Abb. 5).

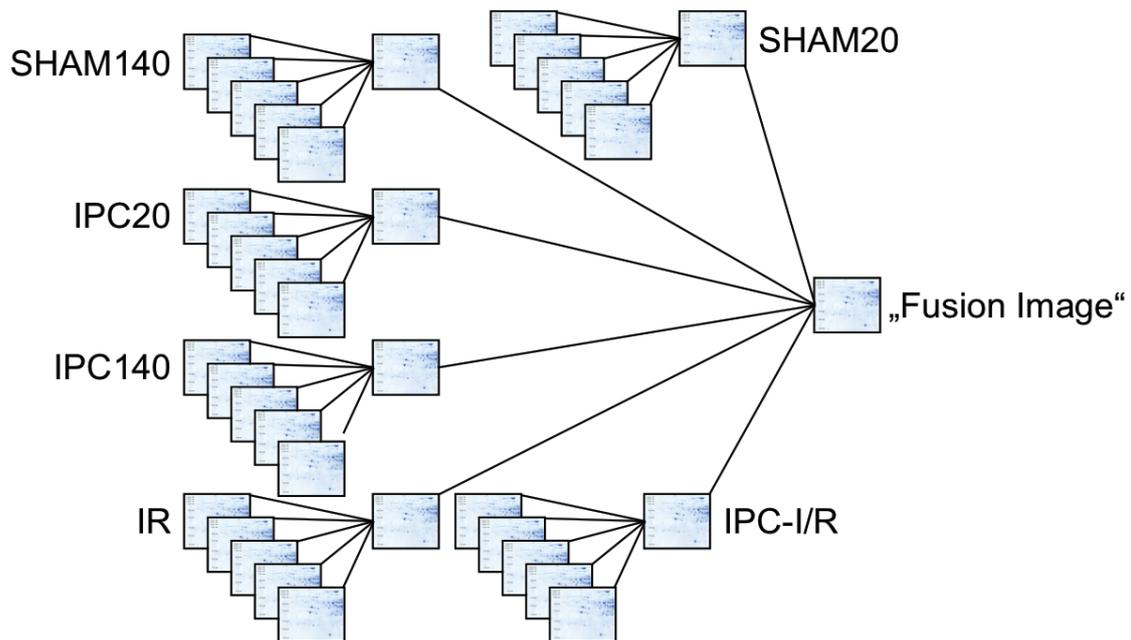


Abb. 5 **Struktur des 2D-Projektes (Delta 2D):** Die Bilder einer Gruppe wurden gegen ein repräsentatives Bild der Gruppe *gewarped*. Dieses wurde wiederum gegen das Fusionsbild (aller sechs repräsentativen Bilder) *gewarped*. Die schwarzen Verbindungslinien zeigen an, welche Gelbilder gegeneinander *gewarped* wurden.

Auf dem Fusionsbild wurde eine *Spot-detection* durchgeführt. Die Software erkennt und markiert automatisch alle Proteinspots auf dem Fusionsbild. Manuell wurden falsch erkannte Spot-Umrisse entfernt oder nachbearbeitet (in der Größe und Form angepasst). Jedem Proteinspot wurde eine Spot-ID zugeordnet und die Spot-Umrisse des Fusionsbildes auf alle anderen Gruppenbilder übertragen (Spot-Transfer). Mittels zweiseitigem t-Test wurden in jedem Projekt die in Tabelle 7 aufgeführten Vergleiche durchgeführt. Hierfür berechnete die Software normalisierte Spot-Volumen (%Vol). Die Intensität und die Fläche eines Spots bildeten ein Spotvolumen, welches anteilig an allen Spotvolumina eines Gelbildes berechnet wurde. Auf diese Weise hatten Unterschiede der aufgetragenen Proteinmenge für die statistische Auswertung keinen Einfluss. Ein p-Wert von $\leq 0,03$ wurde als signifikant betrachtet.

Tabelle 7 Einzelvergleiche

Gruppe 1	vs.	Gruppe 2	Aspekt des Vergleichs
1) IPC20	vs.	SHAM20	Einfluss der reinen IPC auf die zytosolische Proteinexpression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine nach 20 min
2) IPC140	vs.	SHAM140	Einfluss der reinen IPC auf die zytosolische Proteinexpression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine nach 140 min
3) IR	vs.	SHAM140	Einfluss der IR auf die zytosolische Proteinexpression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine
4) IPC-IR	vs.	IR	Einfluss der IPC in Kombination mit IR auf die zytosolische Proteinexpression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine
5) IPC-IR	vs.	IPC140	Einfluss der IR in Kombination mit IPC auf die zytosolische Proteinexpression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine
6) SHAM140	vs.	SHAM20	Einfluss der OP-Zeit auf die zytosolische Proteinexpression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine bei SHAM-Tieren
7) IPC140	vs.	IPC20	Einfluss der OP-Zeit auf die zytosolische Proteinexpression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine bei IPC-Tieren

Sieben Vergleiche unterschiedlicher Gruppen. (SHAM20: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt $t = 20$ min, SHAM140: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IPC20: Tiere mit IPC zum Zeitpunkt $t = 20$ min, IPC140: Tiere mit IPC zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IR: Tiere mit IR zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IPC-IR: Tiere mit IPC gefolgt von IR zum Zeitpunkt $t = 140$ min)

Der Einfluss der reinen IPC auf die Phosphorylierung und Expression von zytosolischen Proteinen wurde unmittelbar nach 20 min und nach 140 min durch den Vergleich der IPC20- bzw. IPC140-Gruppe mit der SHAM20- bzw. SHAM140-Gruppe beurteilt (Vergleich 1 und 2). Der Einfluss der reinen IR und der IR in Kombination mit IPC auf die Phosphorylierung und Expression von zytosolischen Proteinen wurde durch den Vergleich der IR- mit der SHAM140-Gruppe und der IPC-IR- mit der IPC140-Gruppe beurteilt (Vergleich 3 und 5). Der Einfluss der IPC in Kombination mit der IR wurde durch den Vergleich der IPC-IR- mit der IR-Gruppe beurteilt (Vergleich 4) und der Einfluss der reinen Liegezeit bzw. Operationszeit wurde durch den Vergleich der SHAM140- mit der SHAM20-Gruppe und der IPC140- mit der IPC20-Gruppe beurteilt (Vergleich 6 und 7).

Um die Einzelvergleiche visuell zu evaluieren, wurden Bildausschnitte einzelner Proteinspots in Spot-Alben exportiert und im *Webbrowser* betrachtet. Die Auswertung wurde für die ProQ-DPS-gefärbten und die Coomassie-gefärbten Gelbilder in gleicher Weise vorgenommen. Die Schnittmenge der Projekte (technisches Replikat A, Replikat B und Replikat C) wurde manuell bestimmt. Nur die Proteinspots, die in allen drei technischen Replikaten gleichsinnig hoch- oder herunterreguliert wurden, wurden aus einem repräsentativen Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Um die ProQ-DPS-gefärbten Proteinspots (Fluoreszenzfärbung) auf dem Coomassie-gefärbten Gel zu identifizieren, wurde in einem gesonderten 2D-Projekt ein ProQ-DPS-gefärbtes gegen ein Coomassie-gefärbtes Gelbild *warped* und auf der Überlagerung die entsprechenden Coomassie-Proteinspots markiert.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der 2D-Gele erfolgte mittels zweiseitigem t-Test und der Delta 2D Software (Version 4.3) von Decodon (Decodon GmbH, Greifswald, Deutschland). Als Signifikanzniveau wurde ein $p \leq 0,03$ gewählt ($n = 6$ /Gruppe, 3 technische Replikate). Für die statistische Auswertung der Transaminasen wurde ebenfalls ein zweiseitiger t-Test, jedoch mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ ($n = 6$) sowie die Microsoft Excel-Software verwendet (Microsoft® Excel® für Mac 2008, Version 12.0, Redmond, USA).

2.9 Identifikation der Proteine mittels Massenspektrometrie

2.9.1 Tryptischer in-Gel Verdau

Die Proteinspots wurden mit einem Skalpell auf einem Leuchttisch ausgeschnitten und in 1 mm x 1 mm große Gelstückchen zerkleinert. Bei sehr kleinen Proteinspots wurden entsprechende Proteinspots aus verschiedenen Gelen gepooled, um genügend Protein für eine Identifikation zu erhalten. Die gefärbten Gelstückchen wurden in 0,5 ml LoBind Reagenzgefäße (Eppendorf LoBind® tube) überführt und mehrmals mit 100 µl Destain Solution Coomassie entfärbt. 50 µl Acetonitril (ACN, 100%) und 50 µl Ammoniumhydrogencarbonat (25 mM) wurden zu den Gelstückchen gegeben und für 10 min gemischt. Der Überstand wurde mit einer Geloader Spitze (GELoader Tip®, Eppendorf, Deutschland) auf normaler Pipettenspitze abgenommen und in einem separaten Reagenzgefäß gesammelt. Es wurden nochmals 50 µl ACN (100%) und 50 µl Ammoniumhydrogencarbonat (25 mM) dazu gegeben und für weitere 30 min gevortext. Dieser Waschschrift wurde weitere zweimal wiederholt und der Überstand jeweils in dem separaten Reagenzgefäß gesammelt.

Danach wurde mit ACN für 30 min gevortext und der Überstand gesammelt. Nach den Waschsritten wurden die Gelstückchen mit einer Vakuumzentrifuge (Concentrator plus, Eppendorf) getrocknet. Die getrockneten Gelstückchen wurden mit Trypsinlösung (200 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8) mit 20 µg Trypsin (modifiziertes Trypsin: *Proteomics Grade*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bedeckt und für 30 min bei 4 °C rehydriert. Nach der Rehydratation wurde die überschüssige Trypsinlösung abgenommen, die Gelstückchen mit ca. 100 µl - 200 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat überschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach dem tryptischen Verdau wurden die Peptide aus den Gelstückchen eluiert. Hierfür wurden die Gelstückchen abzentrifugiert und der Überstand in einem Reagenzgefäß (Eppendorf LoBind® tube) gesammelt. Es wurde das doppelte Volumen MilliQ-Wasser (im Vergleich zu dem Trypsinlösung/Puffer-Gemisch) hinzugefügt, für 5 min gemischt und für weitere 5 min in einem Ultraschallbad (Sonorex Super RK100SH, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) inkubiert. Die Gelstückchen wurden abzentrifugiert und der Überstand in einem Reagenzgefäß gesammelt. Es wurde dreimal mit Elutionspuffer (50 ml ACN, 5 ml Ameisensäure, 45 ml MilliQ-Wasser) für 30 min geschüttelt, abzentrifugiert und der Überstand in einem Reagenzgefäß gesammelt. Nach den Elutionsschritten wurden die Gelstücke mit ACN (100%) dehydriert, für 30 min geschüttelt, abzentrifugiert und der Überstand in dem Reagenzgefäß gesammelt. Die eluierten Peptide wurden in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert.

2.9.2 Massenspektrometrie

Die verdauten Proteine wurden durch T. Strahl (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und Dr. S. Metzger (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mittels ESI-MS (Q-STAR XL, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) sowie mittels Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gekoppelt mit einem nanoUHPLC System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) identifiziert. Da die Massenspektrometrie nicht von mir selbst angewandt wurde, sollen im Folgenden die grundsätzlichen Prinzipien der Massenspektrometrie nur der Vollständigkeit halber dargestellt werden.

Mit Hilfe eines Massenspektrometers (MS) kann die Masse eines Moleküls mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Ein Massenspektrometer setzt sich aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor zusammen. Die Ionenquelle dient dazu, den Analyten, also das Molekül, dessen Masse bestimmt werden soll, zu ionisieren und in ein Hochvakuum einzuschleusen. Im Massenanalysator werden die Ionen nach dem Verhältnis ihrer Masse zur

Ladung (m/z) aufgetrennt, durch den Detektor registriert und visuell in einem Massenspektrum dargestellt. Es gibt unterschiedliche Verfahren, um aus den gemessenen Protein- bzw. Peptidmassen Rückschlüsse auf das „Ausgangs-Protein“ zu ziehen.

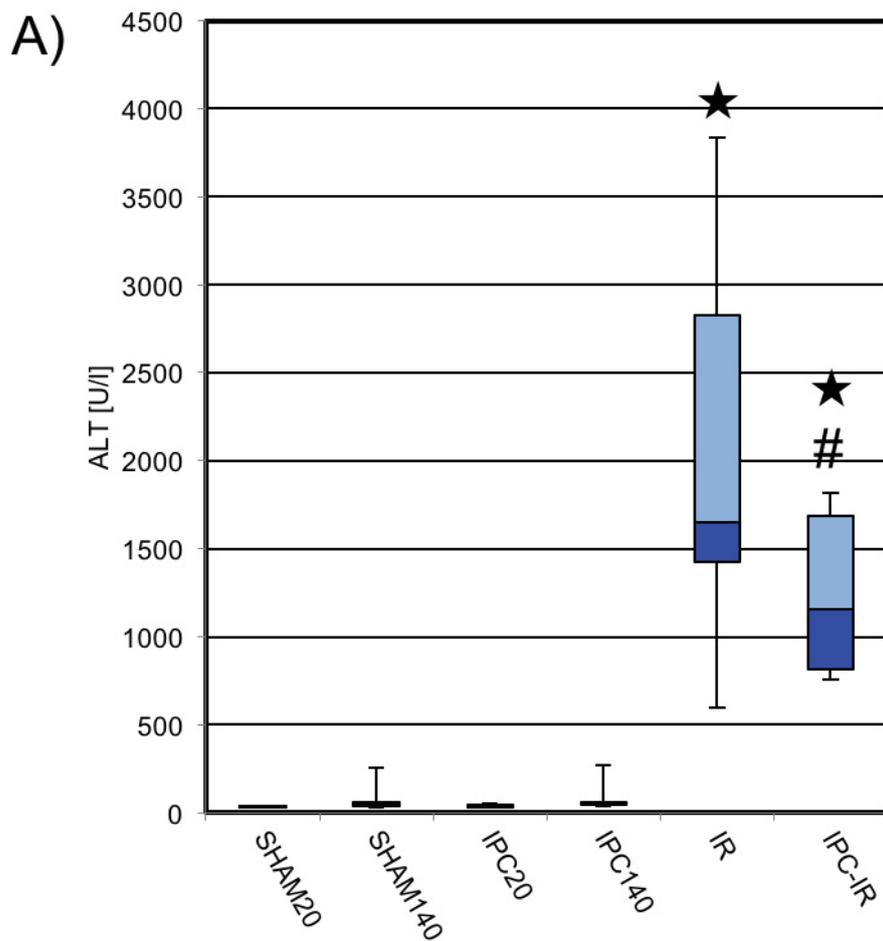
Eine Methode ist der *Peptidmassfingerprint*. Dabei wird die gemessene Peptidmasse mit einer Datenbank (z.B. *Mascot*) für bekannte Proteine oder mit einer Genomdatenbank abgeglichen. In der Datenbank lassen die sich Proteine virtuell (*in silico*) mittels Trypsin in Peptide schneiden und deren Massen berechnen. Gemessene Peptidmassen lassen sich mit den *in silico* berechneten Peptidmassen vergleichen und somit einem Protein zuordnen. Je mehr Peptidmassen bestimmt werden und mit den *in silico* berechneten Peptidmassen übereinstimmen, desto größer ist die Sicherheit, dass das richtige Protein identifiziert wurde.

Voraussetzung, um mit dieser Methode ein Protein identifizieren zu können ist, dass es in einer Datenbank zu finden ist und dass kein komplexes Proteingemisch (= mehrere unterschiedliche Proteine) analysiert werden. Ist ein Protein bis dato in keiner Datenbank bekannt so kann mittels Massenspektrometrie auch eine *De-Novo*-Peptidsequenzierung vorgenommen werden. Hierbei werden isolierte Peptide in einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) z.B. durch Kollision mit einem Gas (Stickstoff) fragmentiert. Zur Nutze macht man sich, dass die Peptide vor allem an den Peptidbindungen „brechen“. Mit Hilfe der bekannten Aminosäure-Massen, lassen sich Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz ziehen.

3 Ergebnisse

3.1 Reduktion der Transaminasen im Serum durch IPC

Die Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) wurden als Marker für einen akuten, hepatozellulären Schaden verwendet (Abb. 6). Eine Ischämie und Reperfusion (IR) führte zu einem signifikanten Anstieg dieser Enzyme verglichen mit SHAM-Tieren ($n = 6$, $p < 0,05$). Die Kombination von IPC und IR reduzierte die Transaminasen signifikant ($n = 6$, $p < 0,05$) verglichen mit der IR-Gruppe. Die alleinige IPC hatte keinen Einfluss im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollen (SHAM). Die Liegezeit (SHAM140 vs. SHAM20 und IPC140 vs. IPC20) beeinflusste die Transaminasen ebenfalls nicht signifikant.



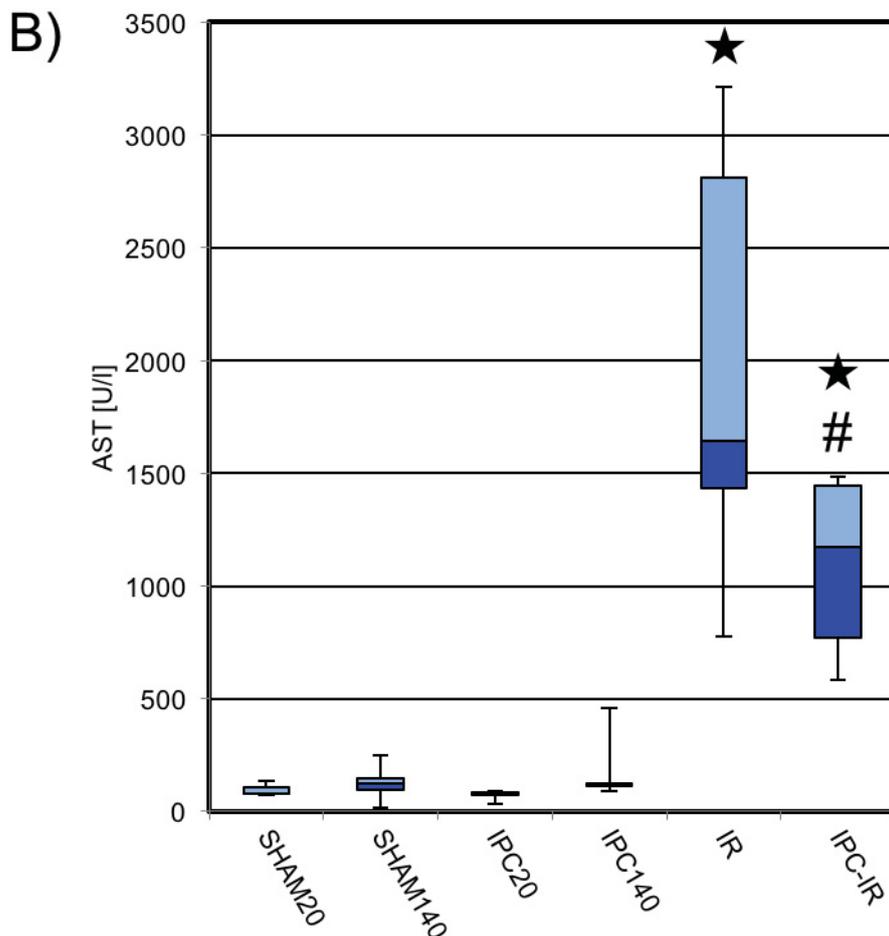


Abb. 6 Einfluss der Interventionen auf den hepatozellulären Schaden, gemessen an den Leberenzymen (A) Alaninaminotransferase (ALT) und (B) Aspartataminotransferase (AST). SHAM20: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt $t = 20$ min, SHAM140: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IPC20: Ischämische Präkonditionierung mit 10 min Ischämie und 10 min Reperfusion zum Zeitpunkt $t = 20$ min, IPC140: Ischämische Präkonditionierung mit 10 min Ischämie und 10 min Reperfusion zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IR: 60 min Ischämie gefolgt von 60 min Reperfusion zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IPC-IR: IPC gefolgt von IR zum Zeitpunkt $t = 140$ min. Die Angaben sind der Minimalwert, die 25. Perzentile, der Median, die 75. Perzentile und der Maximalwert, $n = 6$, * $p < 0,05$ vs. SHAM140, # $p < 0,05$ vs. IR.

3.2 Isolierung der Leberproteine und Optimierung der 2D-Gelelektrophorese

Das gewonnene Lebergewebe wurde homogenisiert, lysiert und mittels differentieller Zentrifugation in subzelluläre Fraktionen getrennt. Die Reinheit der Fraktionen wurde exemplarisch mittels Western blot geprüft. Da die Western blots zum Großteil von Dipl.-Biol. T. Strahl durchgeführt wurden, sind sie der Vollständigkeit halber im Anhang dargestellt

(Kapitel 6, Abb. 18). Die weitere Auftrennung der zytosolischen Proteine erfolgte mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese. Die Methode war in unserer Arbeitsgruppe etabliert, wurde jedoch in Bezug auf das Lebergewebe angepasst und optimiert. Details zur Optimierung der 2D-Gelelektrophorese finden sich ebenfalls im Anhang (6.2 Optimierung der 2D-Gelelektrophorese). Ein exemplarisches 2D-Gelbild nach Optimierung der Gelelektrophorese zeigt Abb. 7. Es wurden 150 μg der zytosolischen Fraktion in der ersten Dimension nach dem pH (pH 3-10) und vertikal nach dem Molekulargewicht in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt.

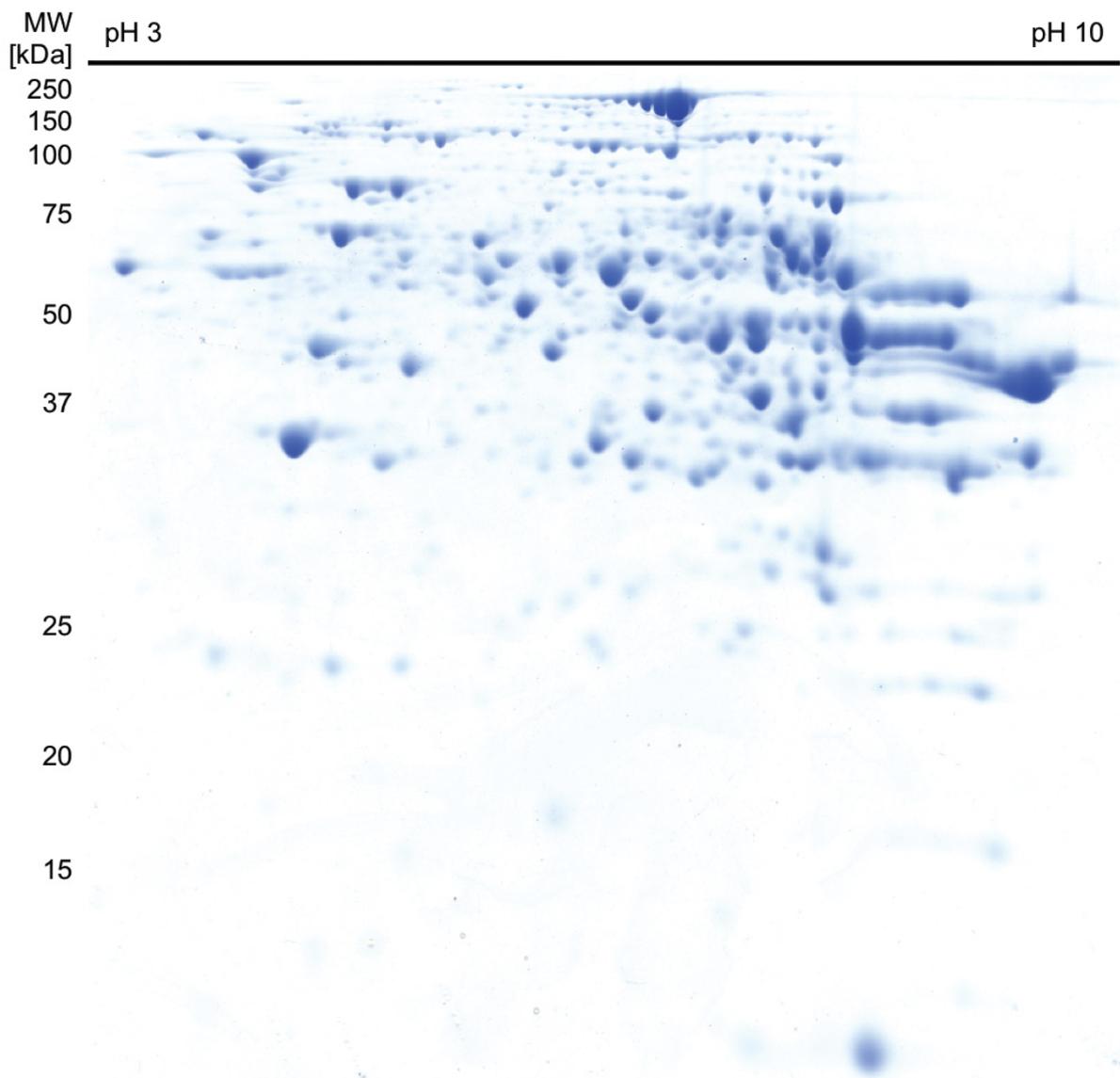


Abb. 7 **Gelbild nach Optimierung der 2D-Gelelektrophorese.** 150 μg Protein der zytosolischen Fraktion wurden in der ersten Dimension nach dem pH (pH 3-10) und vertikal nach dem Molekulargewicht in einem 11%igen PAA-Gel aufgetrennt.

3.3 Etablierung der Phosphatfärbung

Während es sich bei der Coomassie-Färbung um eine weit verbreitete und in unserem Labor etablierte Färbung handelte, musste die ProQ-DPS in Bezug auf Sensitivität und Phosphatspezifität überprüft werden. Abb. 8 zeigt in A) Ausschnitte von drei 1D-Gelen auf denen Ovalbumin in einer Verdünnungsreihe von 800 ng bis 0,78 ng aufgetragen und mit drei Verdünnungen der ProQ-DPS gefärbt wurde.

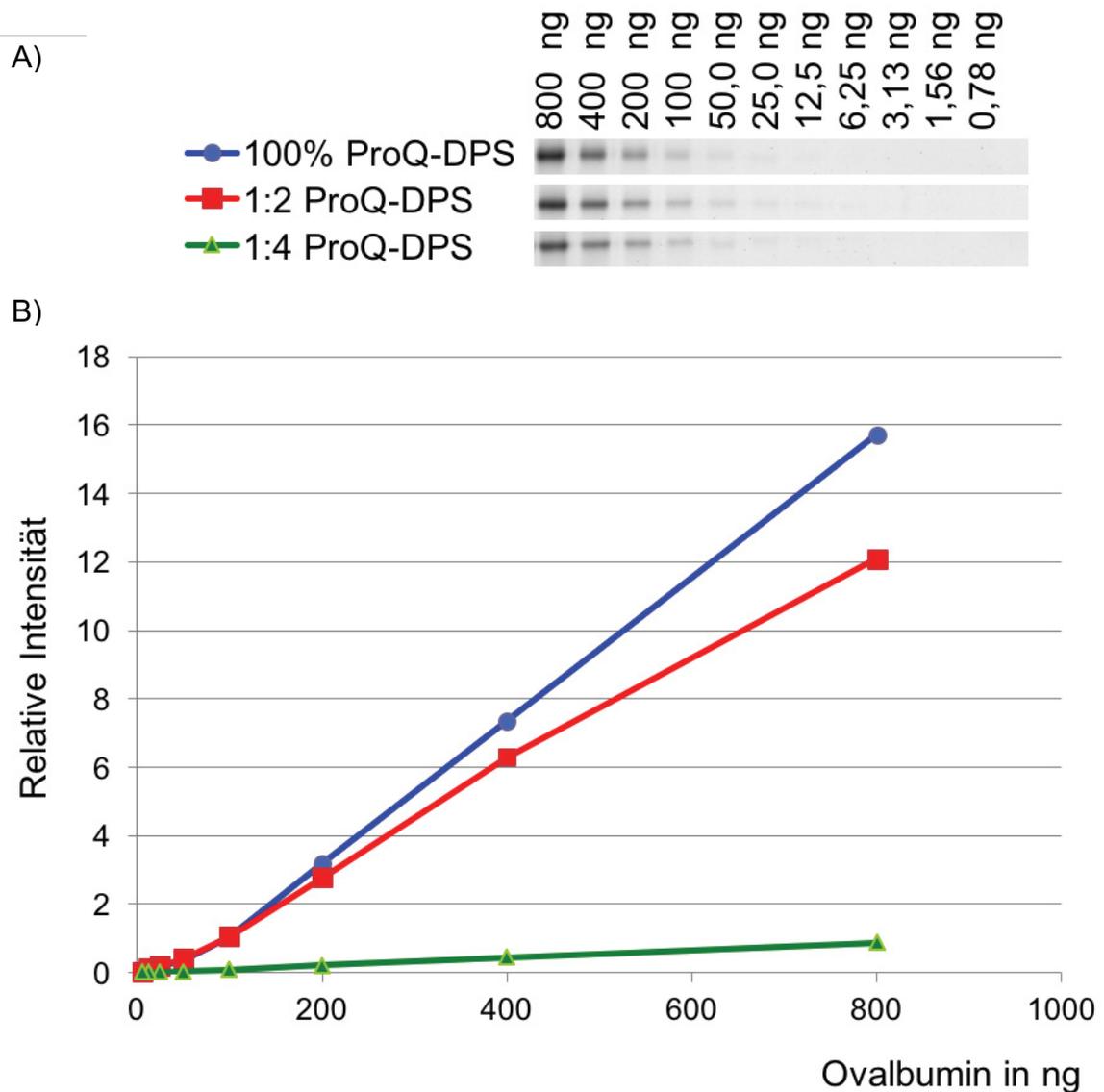


Abb. 8 **Proteinmenge vs. relative Färbeintensität der ProQ-DPS.** (A) Ovalbumin-Banden, gefärbt mit unterschiedlichen Verdünnungen der ProQ-DPS (B) Proteinmenge der Ovalbumin-Bande gegen die relative Intensität der Färbung.

In Abb. 8 B) wurde die Proteinmenge gegen die relative Färbeintensität aufgetragen. Die Färbeintensität der unverdünnten ProQ-DPS unterschied sich bis zu einer Proteinmenge von 200 ng kaum von der 1:2 verdünnten ProQ-DPS. Sowohl bei der unverdünnten als auch bei der

1:2 verdünnten ProQ-DPS bestand eine Linearität zwischen der Intensität und der Proteinmenge. Die Intensität der 1:4 verdünnten ProQ-DPS war wesentlich schwächer als die der unverdünnten ProQ-DPS. Angaben über die Sensitivität der ProQ-DPS waren im Gegensatz zu Färbungen, die alle Proteine anfärben (z.B. Coomassie), nicht allgemein zu treffen. Bei der ProQ-DPS hängt die Intensität von der Proteinmenge und der Anzahl der phosphorylierten Aminosäuren (*Phosphosites*) des Proteins ab. So kann ein Protein, welches neunfach phosphoryliert ist (z.B. α -Casein) genau so intensiv erscheinen, wie ein einfach phosphoryliertes Protein, welches in neunfacher Konzentration vorliegt. Für das Phosphoprotein Ovalbumin (zwei *Phosphosites*) lag die Nachweisgrenze bei ca. 6 ng Ovalbumin/Bande.

Um die Spezifität der ProQ-DPS zu überprüfen, wurden Phosphoproteine mittels alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Es wurden 1D-Gelelektrophoresen analog zur Überprüfung der Sensitivität angefertigt und die Phosphoproteine mittels AP dephosphoryliert. In Abb. 9 ist das Ergebnis der Dephosphorylierung zu sehen. Das 1D-Gel wurde zuerst mit ProQ-DPS (A) und im Anschluss mit Coomassie (B) gefärbt. Aufgetrennt wurden die Proteine Albumin, Ovalbumin, β -Casein und α -Casein mit jeweils 400 ng Protein / Bande. Außerdem wurde die AP mit aufgetragen. Albumin (keine *Phosphosites*) diente als Negativkontrolle. Ovalbumin enthielt zwei *Phosphosites*, β -Casein enthielt fünf und α -Casein neun *Phosphosites*. In den vier *lanes* ist der zeitliche Verlauf der Dephosphorylierung dargestellt. In der ersten *lane* nach 2 h Inkubation mit AP, in der zweiten *lane* nach 1 h Inkubation mit AP, in der dritten *lane* direkt nach der Zugabe der AP und in der vierten *lane* ohne die Zugabe von AP.

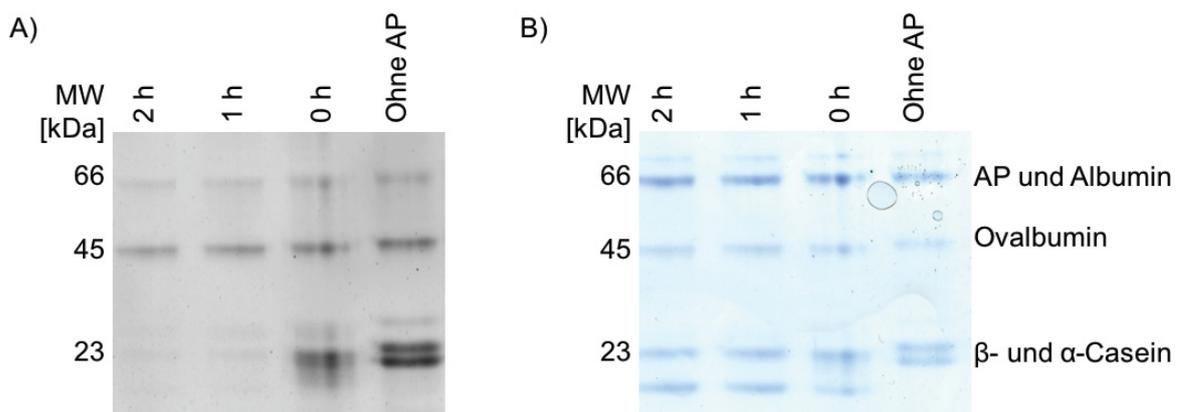


Abb. 9 **Alkalische Dephosphorylierung.** 1D-Gel, (A) ProQ-DPS- und (B) Coomassie-gefärbt (identisches Gel). Aufgetrennt wurden Alkalische Phosphatase (AP), Albumin, Ovalbumin, β -Casein und α -Casein (~ 400 ng / Bande). Die erste *lane* wurde nach 2 h Inkubation mit AP, die zweite *lane* nach 1 h Inkubation mit AP, die dritte *lane* direkt nach der Zugabe der AP und die vierte *lane* ohne die Zugabe von AP aufgetragen.

Nach 1 h Inkubation mit AP waren die α - und β -Casein Banden auf dem ProQ-DPS-gefärbten Gelbild kaum noch sichtbar (Abb. 9, (A)). Die Intensität der Ovalbumin-Bande hatte hingegen auch nach 2 h Inkubation nur geringfügig abgenommen. Da Ovalbumin an Serin 69 und Serin 345 phosphoryliert ist und eine Disulfidbrücke zwischen Aminosäure 74 und 121 besteht, entsprach dies am ehesten einer unvollständigen Dephosphorylierung durch die AP. Das Coomassie-gefärbte Gelbild zeigte, dass auf allen vier Lanes die gleiche Proteinmenge (~400 ng Protein / Bande) aufgetragen wurde (Abb. 9, (B)).

Ein weiterer, sichtbarer Effekt der Dephosphorylierung war der Massenshift der α - und β -Casein-Banden. β -Casein hat ein Molekulargewicht von 25,107 kDa und besitzt fünf Phosphatgruppen. α -Casein hat ein Molekulargewicht von 24,529 kDa und besitzt neun Phosphatgruppen. Die Dephosphorylierung jeder Phosphatgruppe reduzierte das Molekulargewicht um ca. 80 Da. Im phosphorylierten Zustand betrug die Massendifferenz zwischen α - und β -Casein 578 Da. Im komplett dephosphorylierten Zustand lag sie bei 898 Da. Sichtbar war dies durch ein Auseinanderweichen der α - und β -Casein-Banden (Abb. 9, (B)). Der Übergangszustand, in dem α - und β -Casein nur teilweise dephosphoryliert waren, war zum Zeitpunkt 0 h zu sehen.

Für die Proteine α - und β -Casein konnte eine eindeutige Phosphatspezifität der ProQ-DPS nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für das zweifach phosphorylierte Ovalbumin lag bei 6 ng Protein / Bande. Der Vergleich unterschiedlicher Verdünnungen der ProQ-DPS mit Wasser zeigte, dass die Färbelösung 1:2 verdünnt verwendet werden konnte, was erhebliche Materialkosten einsparte.

3.4 Einfluss von IPC und IR auf das zytosolische Subproteom der Leber

Um die Expression und die posttranslationalen Phosphorylierungen zytosolischer Proteine der verschiedenen Interventionsgruppen vergleichen zu können, wurden die Intensitäten der Proteinspots quantitativ erfasst und statistisch ausgewertet. Insgesamt gab es sieben Vergleiche unterschiedlicher Gruppen, die jeweils andere Aspekte der IPC bzw. IR herausstellten (Tabelle 7).

3.4.1 Einfluss von IPC und IR auf das zytosolische Phosphoproteom

Die differentielle Phosphorylierung von Proteinen wurde anhand der ProQ-DPS-gefärbten Gelbilder ausgewertet. Insgesamt wurden 349 Proteinspots in den A-Replikaten, 396 Proteinspots in den B-Replikaten und 374 Proteinspots in den C-Replikaten detektiert. Hiervon

waren 21 Proteinspots in einem oder mehreren Vergleichen (Tabelle 8) differentiell hoch- oder herunterreguliert. In Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12 sind alle differentiellen Phosphoproteinspots auf einem ProQ-DPS-gefärbten Gelbild, auf einer Überlagerung des ProQ-DPS- und Coomassie-gefärbten Gelbildes bzw. einem Coomassie-gefärbten Gelbild markiert und mit Spot-Nummern (#01P bis #21P) beschriftet.

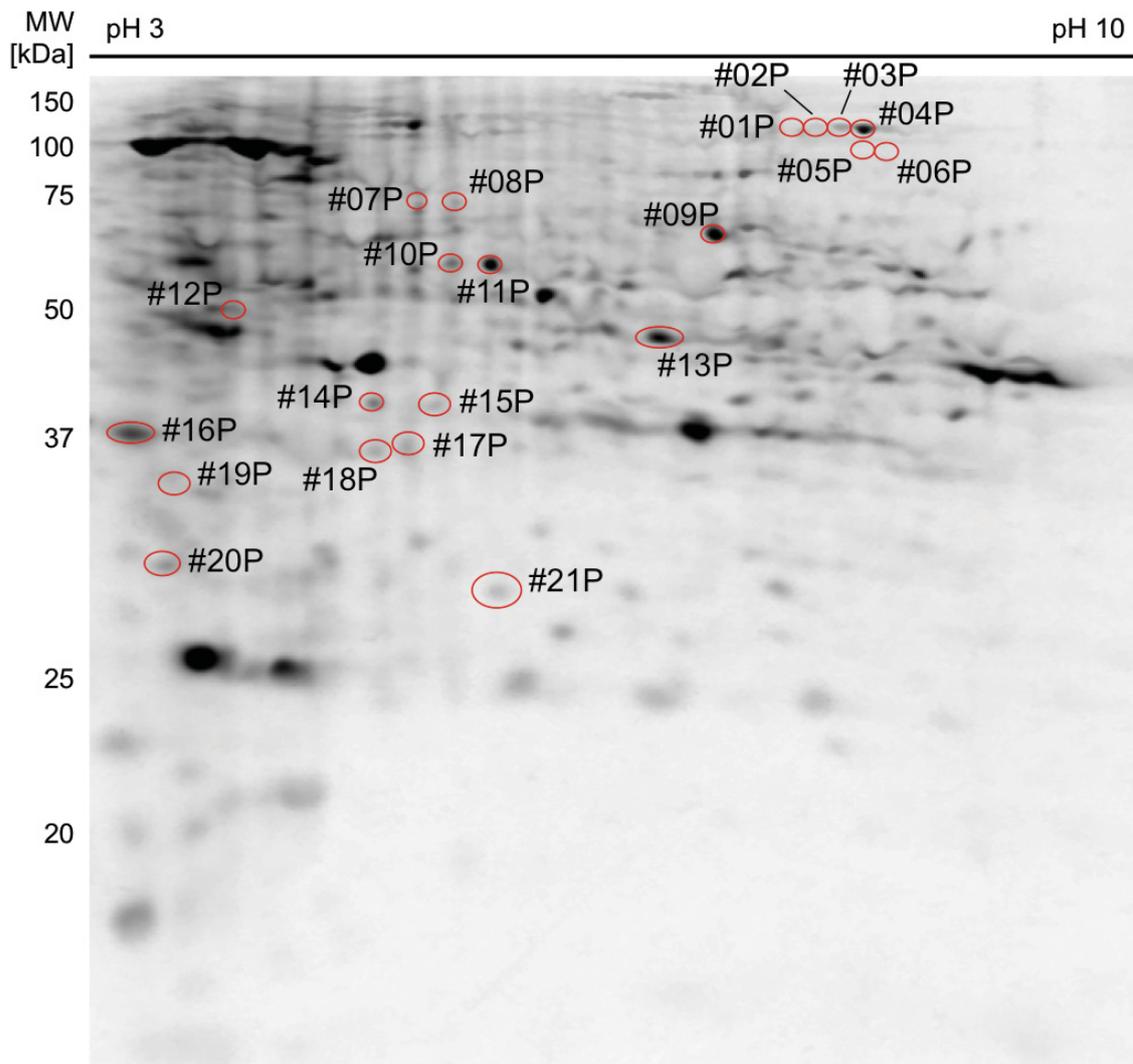


Abb. 10 **Differentielle, ProQ-DPS-gefärbte Proteinspots auf einem repräsentativen Gelbild.**

Um die differentiell regulierten Proteinspots der Fluoreszenzfärbung (ProQ-DPS) den Coomassie-gefärbten Proteinspots zuordnen zu können, wurde ein ProQ-DPS-gefärbtes auf ein Coomassie-gefärbtes Gelbild *gewarped*, d.h. mittels Vektoren übereinander gelagert. Die Überlagerung der beiden Gelbilder ist in Abb. 11 in Falschfarben dargestellt. Die ProQ-DPS-Färbung ist orange und die Coomassie-Färbung blau dargestellt. Die blauen Punkte entsprechen den Anfangs-/Endpunkten der Vektoren.

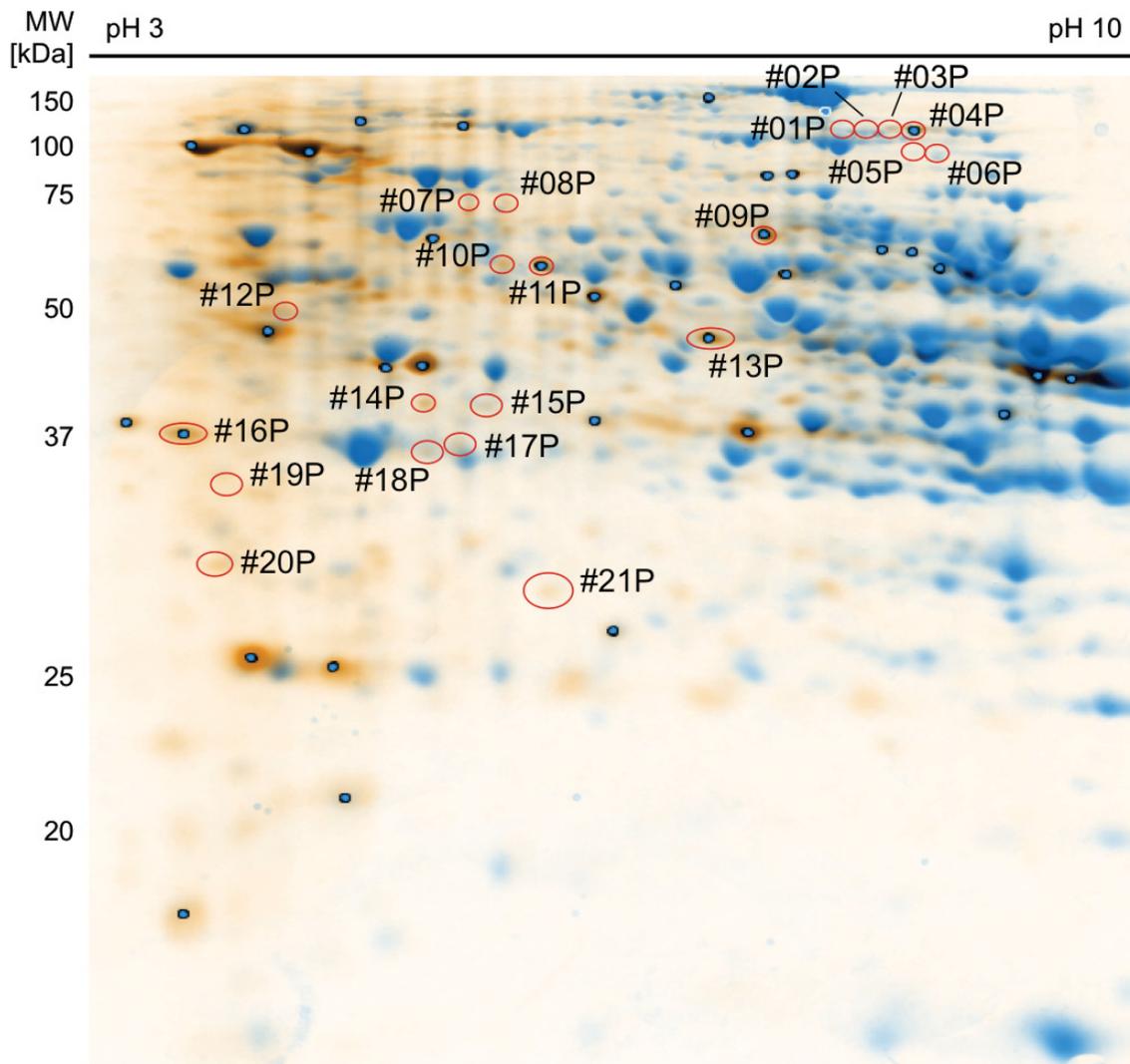


Abb. 11 **Falschfarbendarstellung eines 2D-Gels, welches mit ProQ-DPS und anschließend mit Coomassie gefärbt wurde.** Orange ist das ProQ-DPS- und blau ist das Coomassie-gefärbte Gelbild dargestellt. Die beiden Gelbilder wurden mit der Delta-2D-Software *gewarped* (die blauen Punkte entsprechen den Anfangs-/Endpunkten der Vektoren) und die Markierungen der differentiellen ProQ-DPS-gefärbten Proteinspots übertragen.

In Abb. 12 sind die Markierungen der differentiellen Phosphoproteinspots auf das Coomassie-gefärbte Gelbild übertragen. Ein Großteil der differentiell regulierten Phosphoproteinspots entsprach Coomassie-gefärbten Proteinspots mit sehr geringer Abundanz. Ein Teil der Proteinspots war dadurch einer Identifikation mittels Massenspektrometrie schwer oder gar nicht zugänglich.

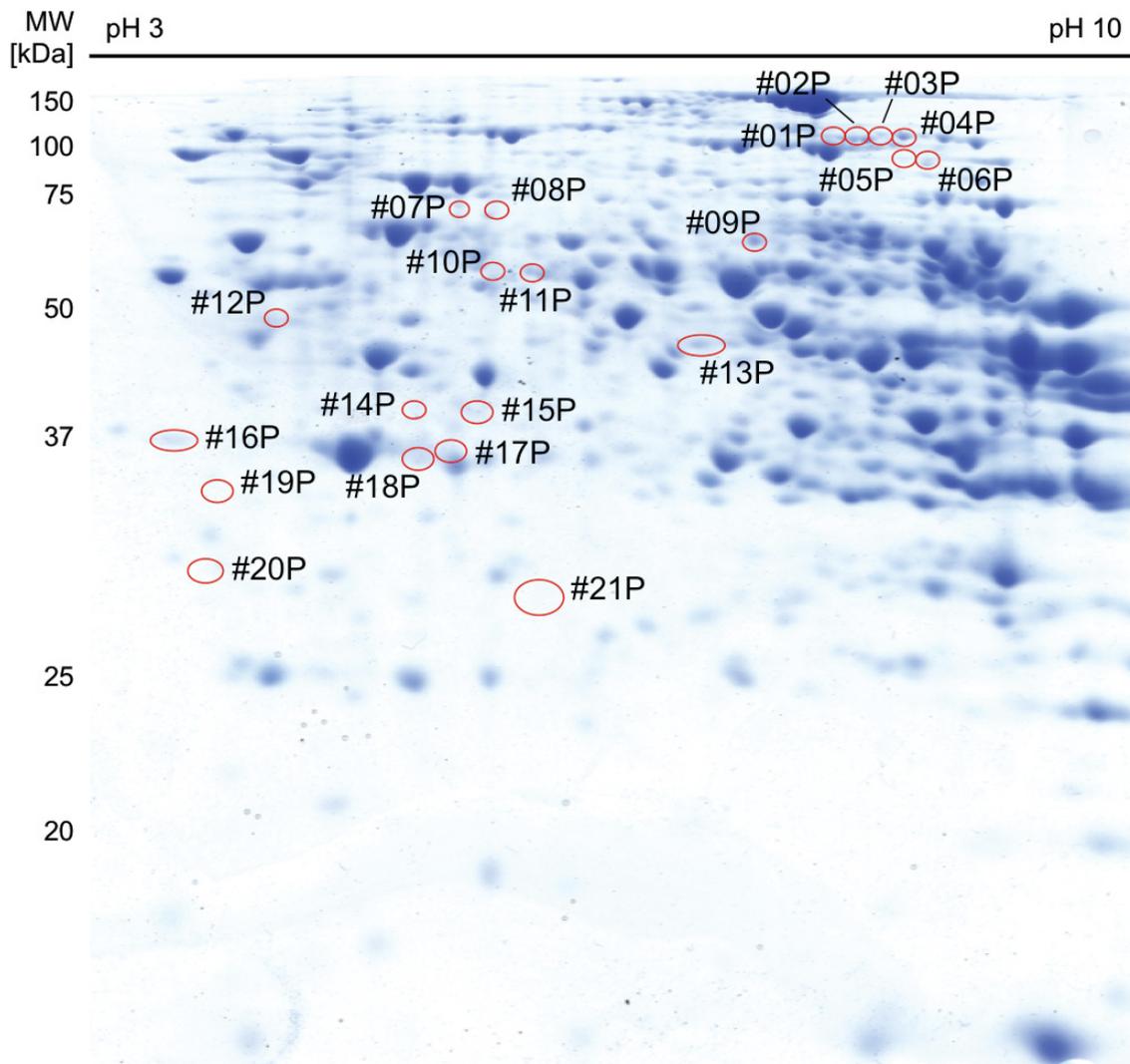


Abb. 12 **Differentielle, ProQ-DPS-gefärbte Proteinspots auf einem repräsentativen, Coomassie-gefärbten Gelbild.**

Die Tabelle 8 gibt Auskunft über die differentiell regulierten Phosphoproteinspots und den Mittelwert der *Ratios* der drei technischen Replikate. Im Folgenden wird einfachheitshalber von *Ratio* gesprochen, wenn der Mittelwert der *Ratios* der drei technischen Replikate gemeint ist. In den Vergleichen IPC20 vs. SHAM20, IPC140 vs. SHAM140 und IPC-IR vs. IPC140 wurden keine differentiell regulierten Proteinspots detektiert. Die meisten differentiell regulierten Phosphoproteinspots wurden unter dem Aspekt der Liegezeit/Operationszeit, also in den Vergleichen SHAM140 vs. SHAM20 und IPC140 vs. IPC20 detektiert. Die relative Standardabweichung (RSD) lag bei den ProQ-DPS-gefärbten Proteinspots durchschnittlich bei 30% - 40%.

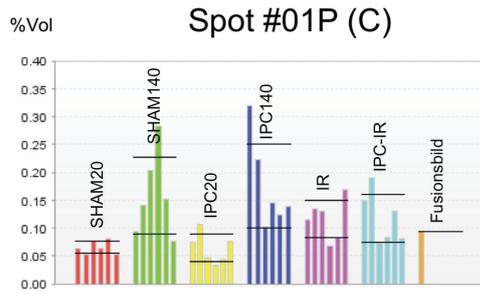
Tabelle 8 Vergleiche differentiell regulierter Phosphoproteinspots

Vergleich	Spot-#	Ratio	
IR vs. SHAM140	#21P	↑ 2,708	
	IPC-IR vs. IPC140	#03P	↓ 0,427
		#09P	↓ 0,413
		#10P	↑ 1,583
		#11P	↑ 2,336
		#12P	↑ 2,087
		#17P	↑ 2,421
		#18P	↑ 1,838
SHAM140 vs. SHAM20	#21P	↑ 6,272	
	#05P	↑ 3,912	
	#06P	↑ 5,358	
	#07P	↑ 3,443	
	#08P	↑ 3,210	
	#20P	↓ 0,354	
	IPC140 vs. IPC20	#01P	↑ 2,816
		#02P	↑ 3,422
#04P		↑ 3,130	
#05P		↑ 8,902	
#06P		↑ 5,040	
#09P		↑ 2,223	
#13P		↓ 0,614	
#14P		↓ 0,512	
#15P		↓ 0,486	
#16P		↓ 0,501	
#19P		↓ 0,110	
#20P	↓ 0,267		
#21P	↓ 0,434		

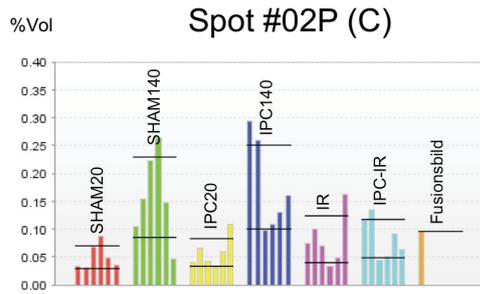
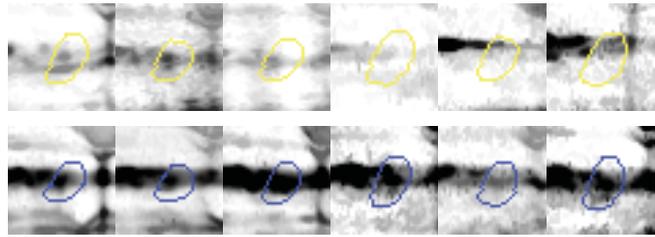
Die *Ratio* entspricht dem Mittelwert der *Ratios* der drei technischen Replikate A, B und C. (SHAM20: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt t = 20 min, SHAM140: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt t = 140 min, IPC20: Tiere mit IPC zum Zeitpunkt t = 20 min, IPC140: Tiere mit IPC zum Zeitpunkt t = 140 min, IR: Tiere mit IR zum Zeitpunkt t = 140 min, IPC-IR: Tiere mit IPC gefolgt von IR zum Zeitpunkt t = 140 min)

In Abb. 13 sind die Expressionsprofile und Spotalben der differentiell regulierten, ProQ-DPS-gefärbten Proteinspots dargestellt. In den Expressionsprofilen wurde das Spotvolumen für alle Interventionsgruppen dargestellt. Das Expressionsprofil und das Spotalbum zeigen exemplarisch nur ein repräsentatives technisches Replikate. Hinter der Spotnummer wurde das technische Replikate in Klammern (A, B, C) angegeben. Bei Proteinspots, die gleichzeitig in mehreren Vergleichen differentiell reguliert waren, konnte es deshalb vorkommen, dass die Expressionsprofile unterschiedlicher technischer Replikate abgebildet wurden (Spot #05P). In den Spotalben wurde der jeweilige Proteinspot in einem vergrößerten Bildausschnitt aller

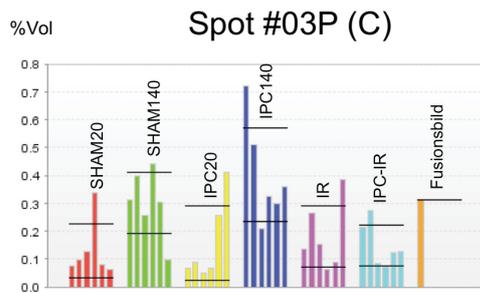
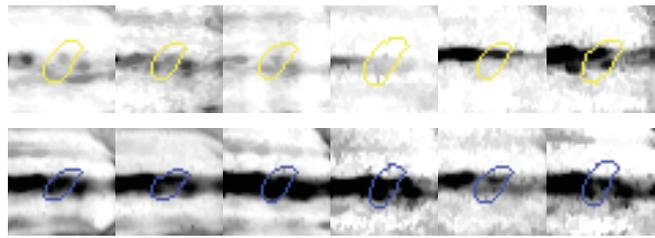
biologischen Replikate herausgestellt. Hier konnten unterschiedliche Kontrasteinstellungen visuell wie eine drastische Proteinregulation wirken, die sich in den Expressionsprofilen nicht widerspiegelten. Details zur Berechnung der normalisierten Spotvolumina finden sich unter 2.7. Die verschiedenen Gruppen sind farblich gekennzeichnet. Rot ist die SHAM20-Gruppe, grün ist die SHAM140-Gruppe, gelb ist die IPC20-Gruppe, blau ist die IPC140-Gruppe, violett ist die IR-Gruppe und türkis ist die IPC-IR-Gruppe dargestellt. Von den 21 differentiell regulierten, ProQ-DPS-gefärbten Proteinspots war ein Proteinspot auch auf den Coomassie gefärbten Gelbildern differentiell reguliert. Der Spot #04P entsprach dem Spot #04C auf den Coomassie-gefärbten Gelbildern. Er war in beiden Fällen im Vergleich IPC140 vs. IPC20 hochreguliert (ProQ-DPS \uparrow 3,13, Coomassie \uparrow 2,11).



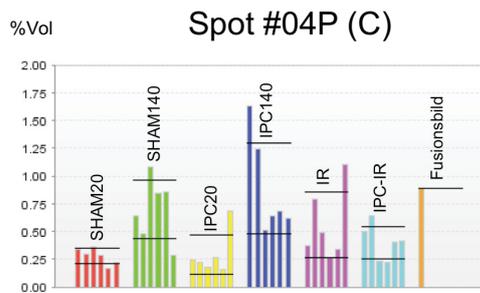
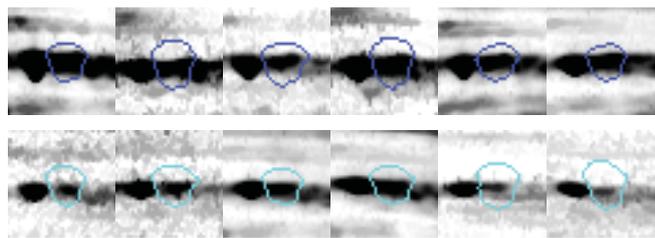
IPC140 vs. IPC20



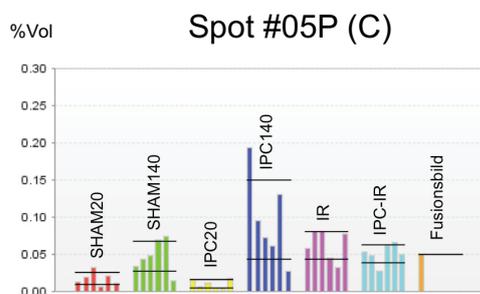
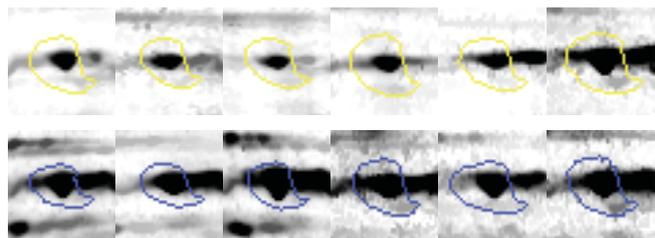
IPC140 vs. IPC20



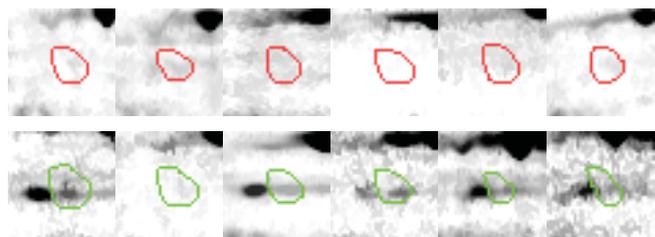
IPC-IR vs. IPC140

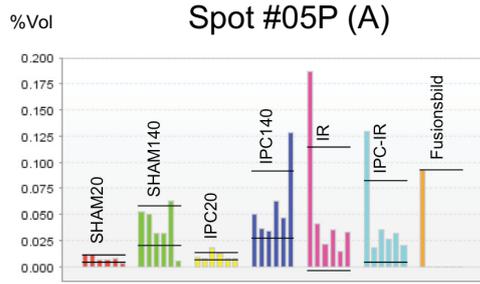


IPC140 vs. IPC20

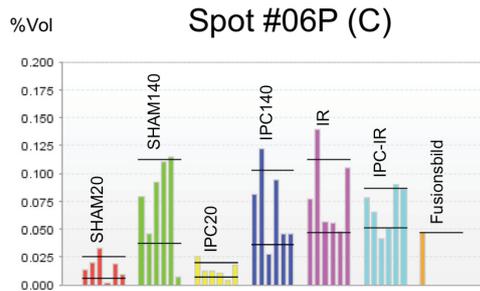
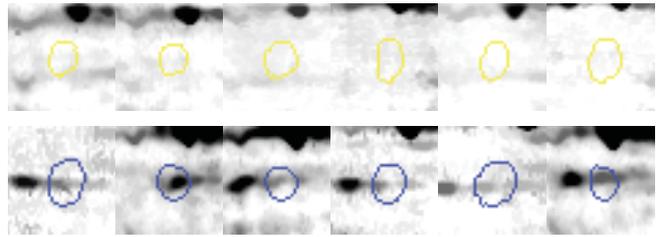


SHAM140 vs. SHAM20

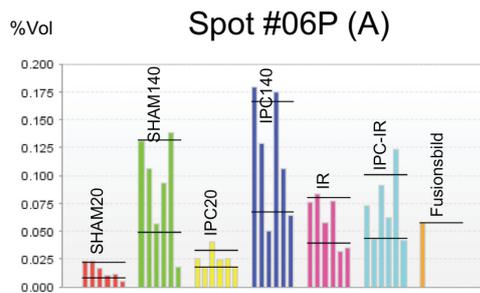
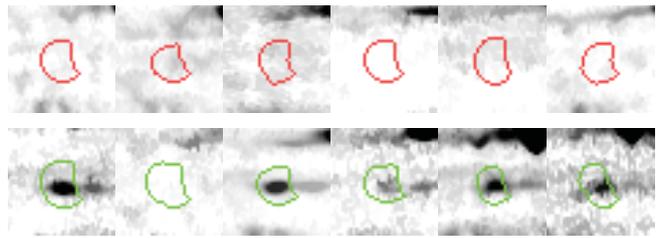




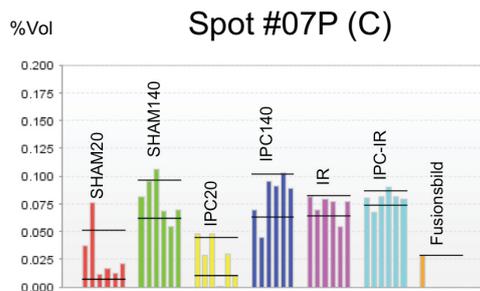
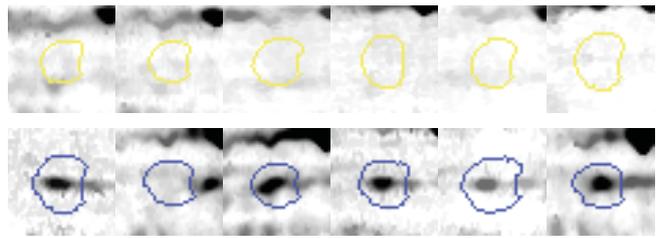
IPC140 vs. IPC20



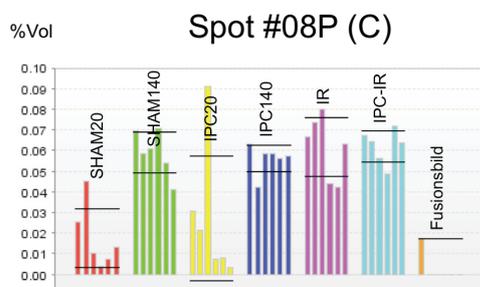
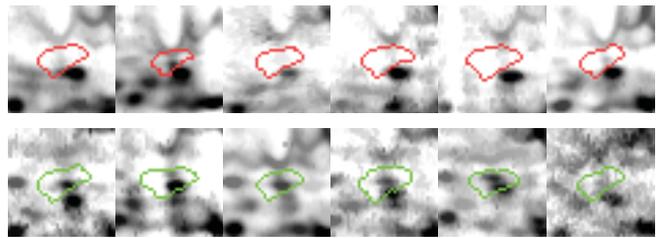
SHAM140 vs. SHAM20



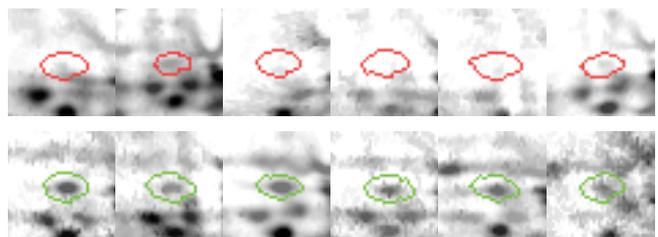
IPC140 vs. IPC20

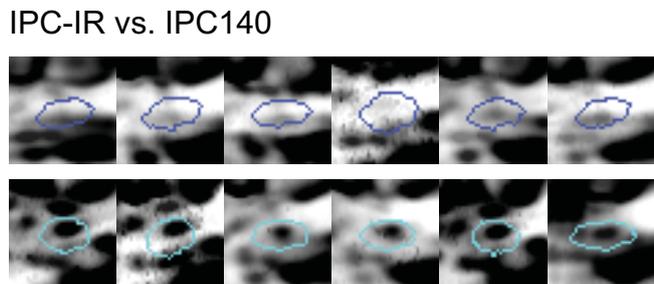
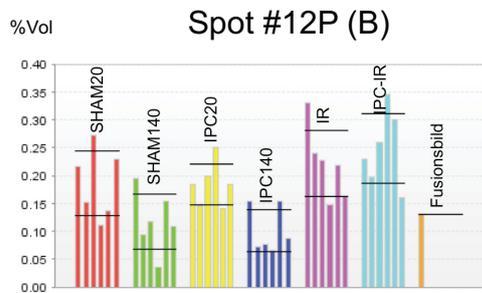
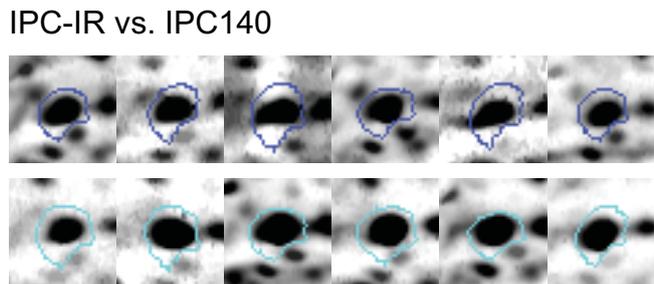
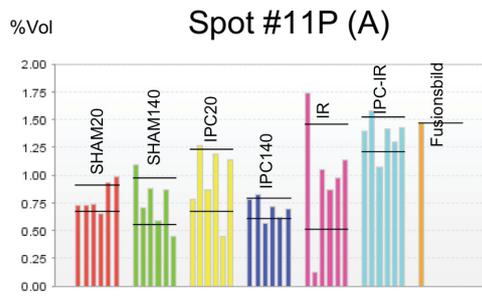
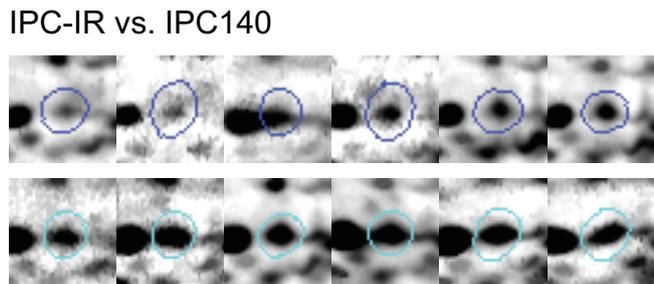
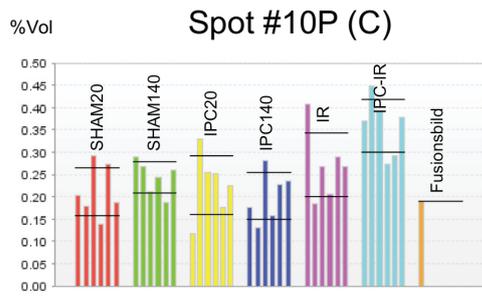
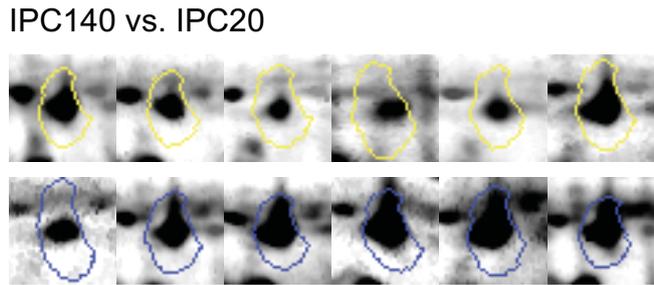
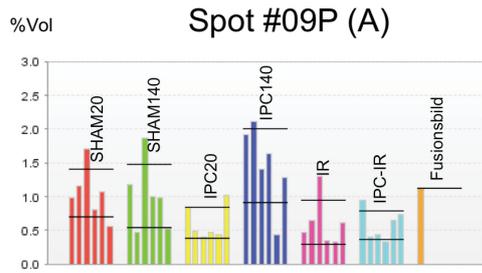
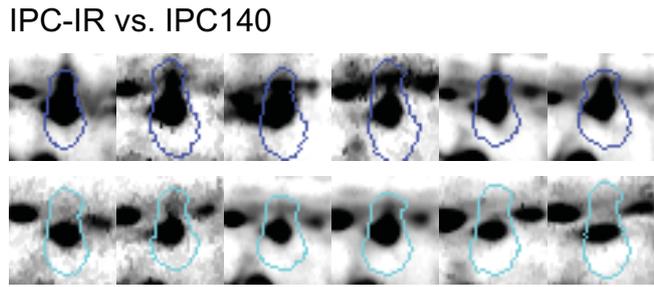
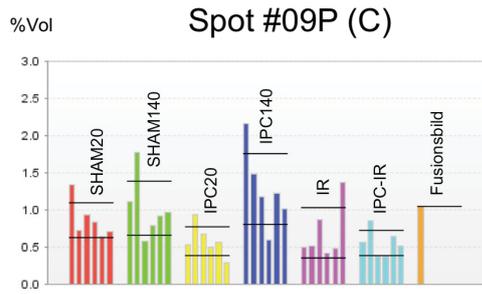


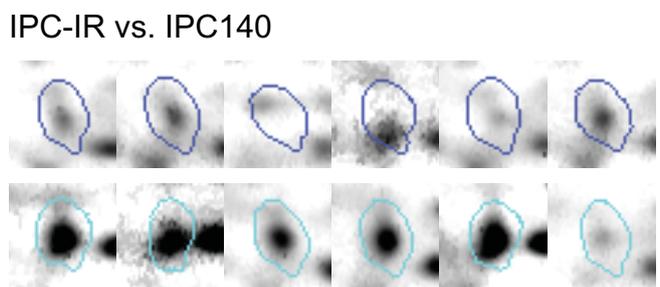
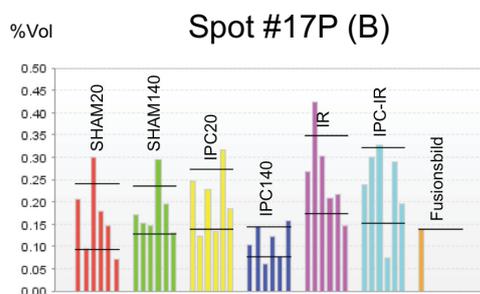
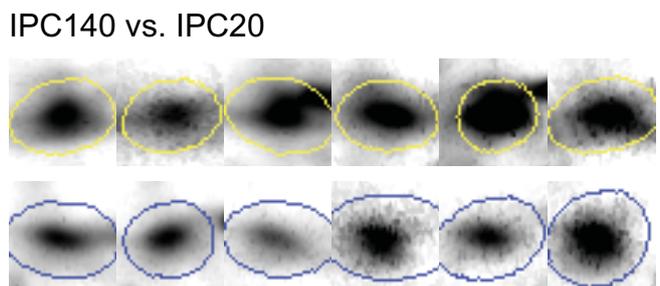
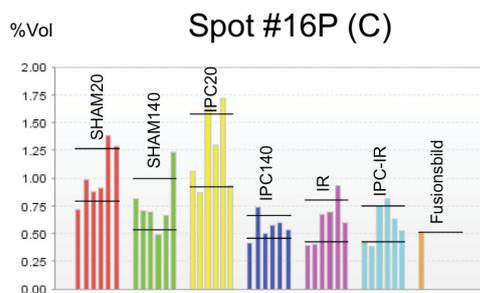
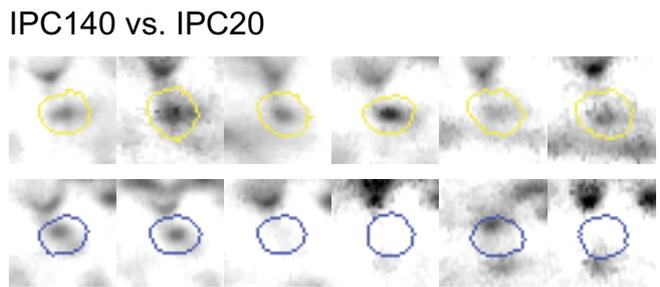
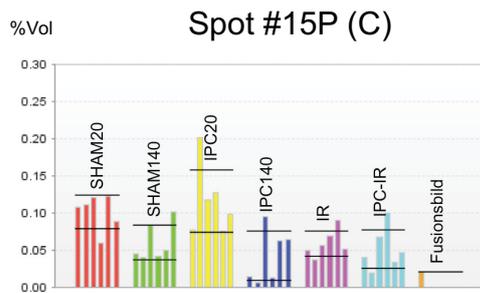
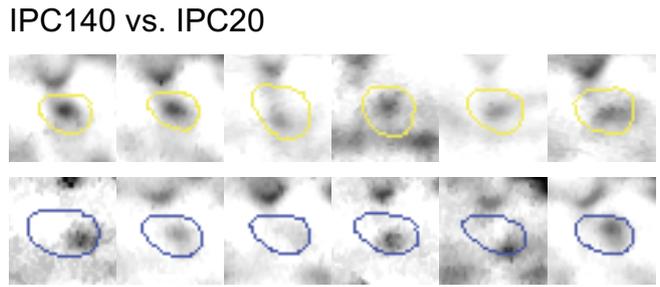
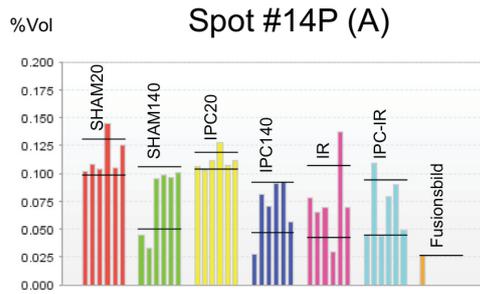
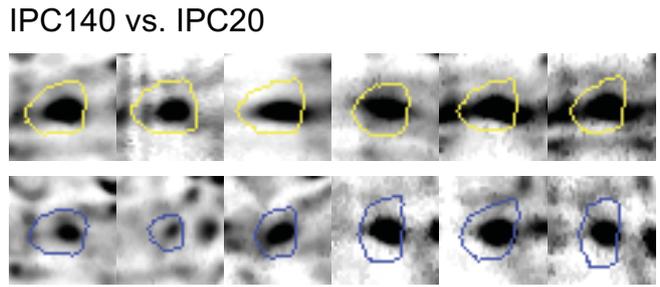
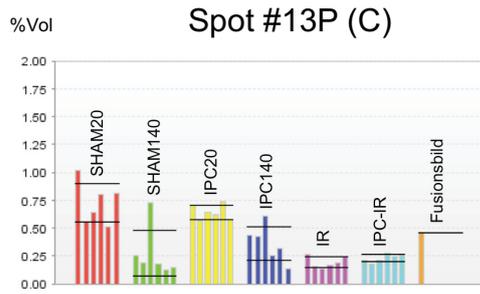
SHAM140 vs. SHAM20

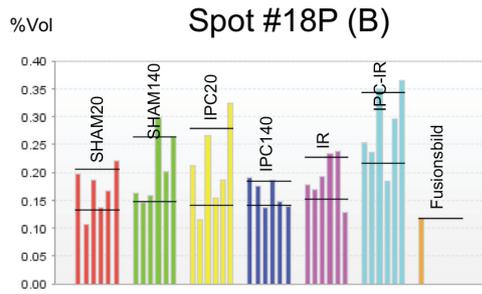


SHAM140 vs. SHAM20

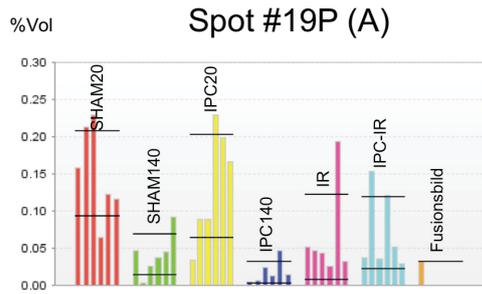
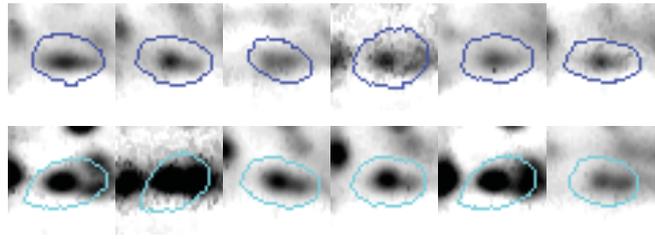




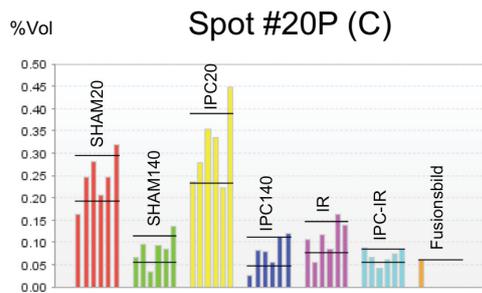
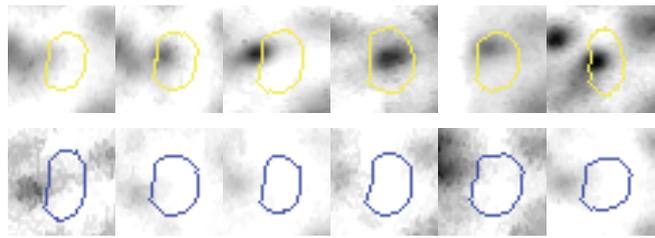




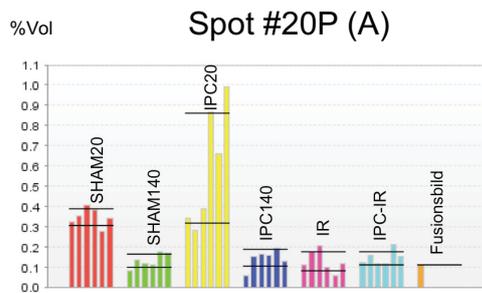
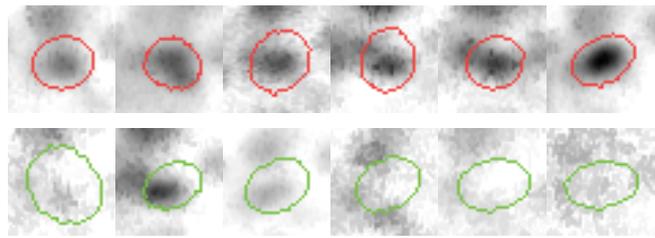
IPC-IR vs. IPC140



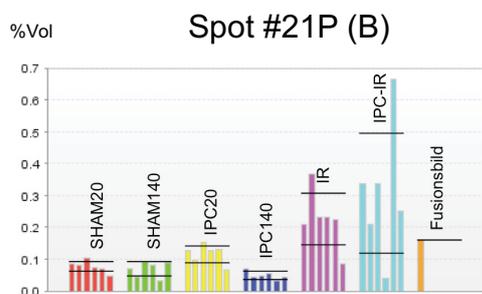
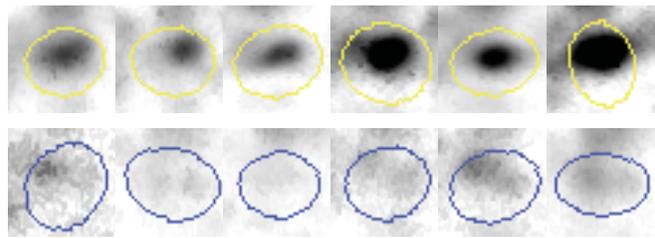
IPC140 vs. IPC20



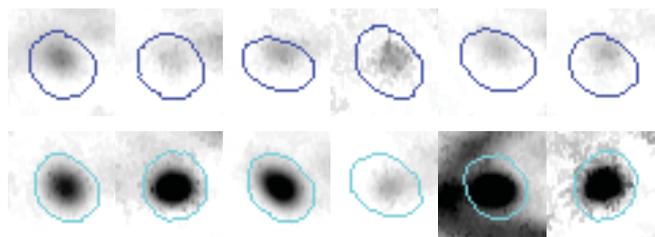
SHAM140 vs. SHAM20



IPC140 vs. IPC20



IPC-IR vs. IPC140



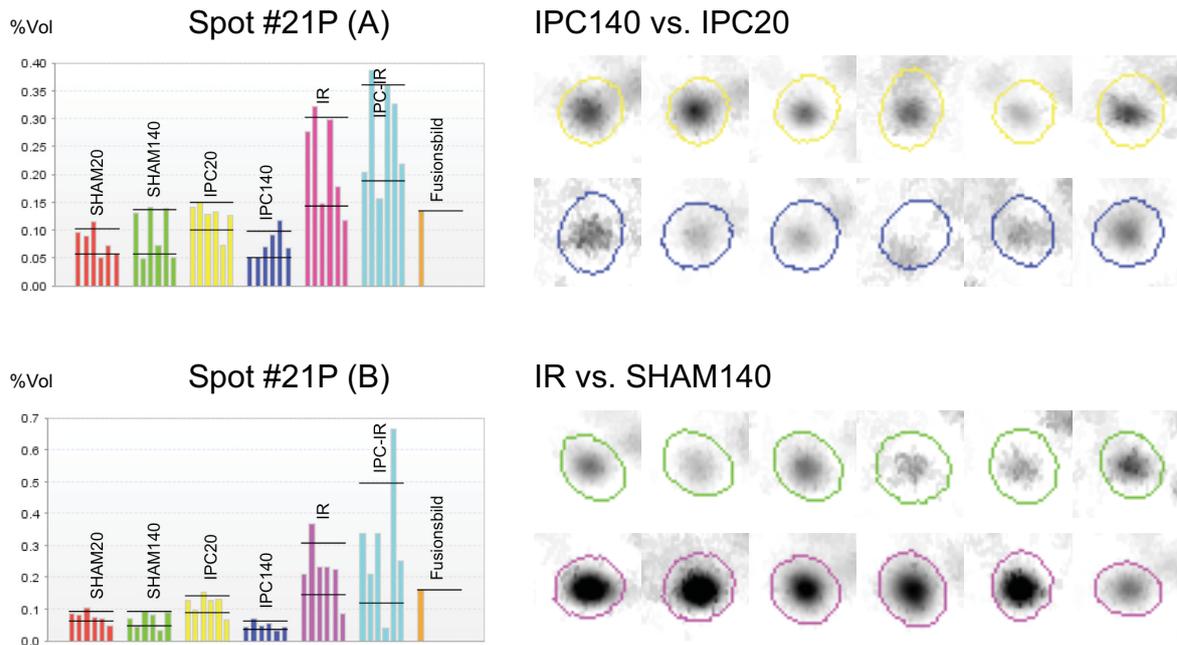


Abb. 13 **Expressionsprofile und Spotalben der differentiell regulierten Phosphoproteinspots.** Die SHAM20-Gruppe ist rot, die SHAM140-Gruppe ist grün, die IPC20-Gruppe ist gelb, die IPC140-Gruppe ist blau, die IR-Gruppe ist violett und die IPC-IR-Gruppe ist türkis markiert. In den Expressionsprofilen ist das normalisierte Spotvolumen (%Vol) für alle Gruppen dargestellt (schwarze Balken entsprechen Mittelwert \pm Standardabweichung). In den Spotalben ist der jeweilige Proteinspot in einem vergrößerten Bildausschnitt aller biologischen Replikate dargestellt. Hinter der Spot # ist in Klammern das jeweilige technische Replikat angegeben.

3.4.2 Einfluss von IPC und IR auf das zytosolische Proteom

Die differentielle Expression wurde anhand der Coomassie-gefärbten Gelbilder ausgewertet. Insgesamt wurden 463 Proteinspots in den A-Replikaten, 469 Proteinspots in den B-Replikaten und 481 Proteinspots in den C-Replikaten detektiert. Hiervon waren 12 Proteinspots in einem oder mehreren Vergleichen differentiell hoch- oder herunterreguliert. In Abb. 14 sind alle differentiell regulierten, Coomassie-gefärbten Proteinspots auf einem repräsentativen Gelbild markiert und mit Spot-Nummern (#01C bis #12C) beschriftet.

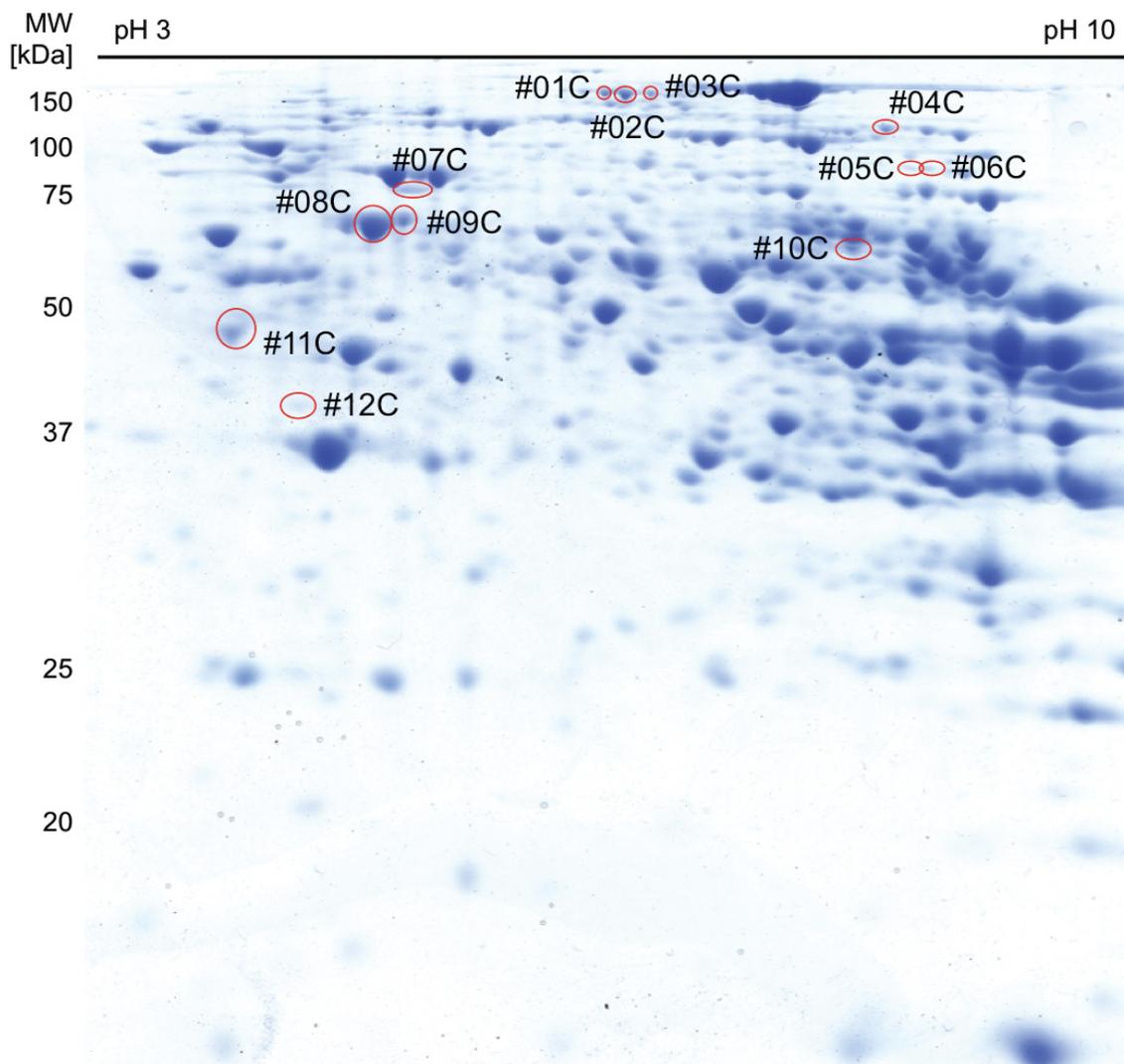


Abb. 14 **Differentiell regulierte, Coomassie-gefärbte Proteinspots auf einem repräsentativen Gelbild.**

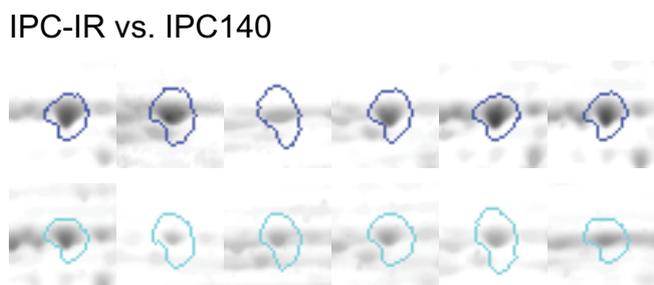
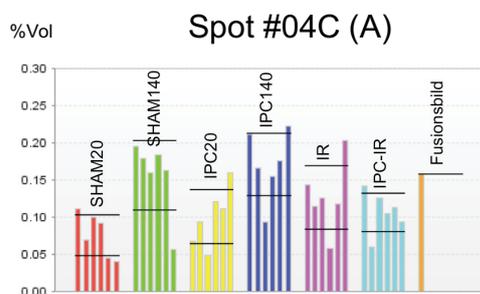
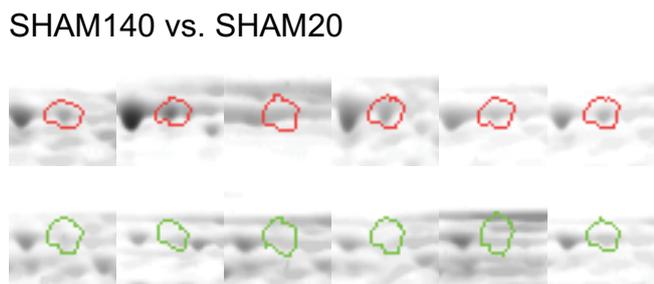
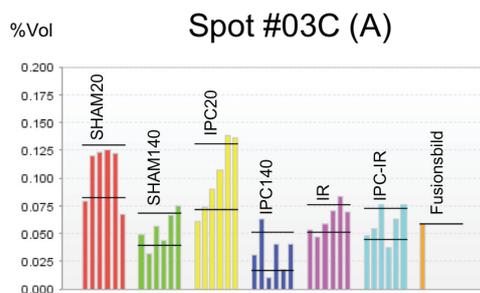
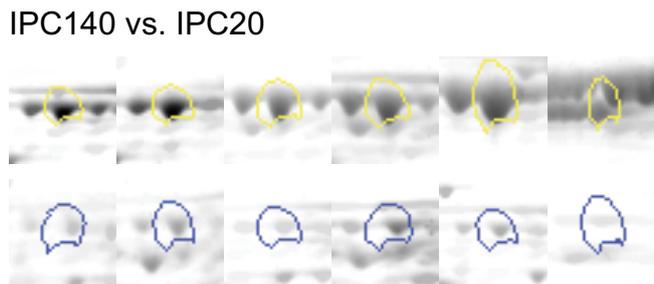
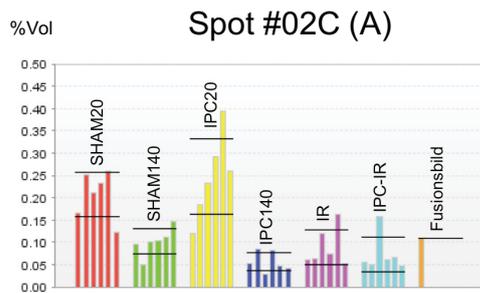
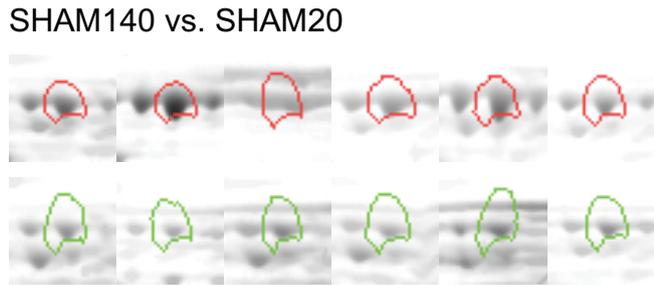
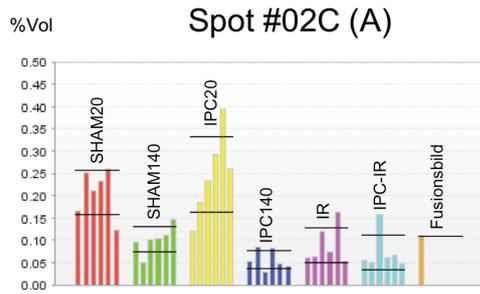
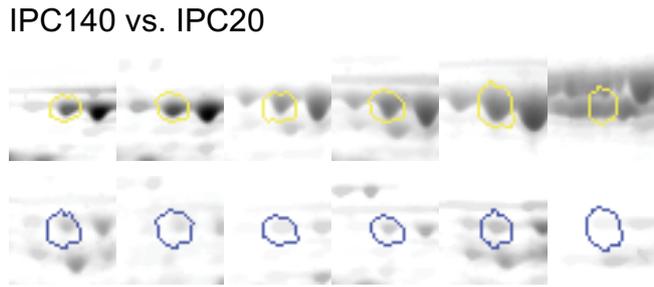
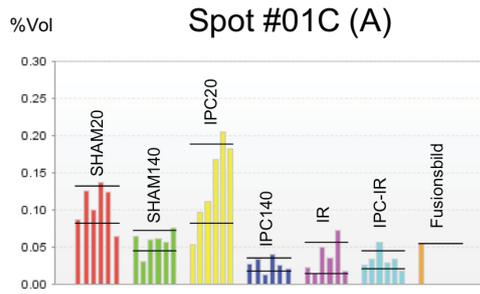
Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Vergleiche, in denen differentiell regulierte Proteinspots detektiert wurden. Im Vergleich von IPC140 vs. SHAM140 und IPC-IR vs. IR wurden keine differentiell regulierten Proteinspots detektiert. Auch die Auswertung der Coomassie-gefärbten Gelbilder ergab die meisten differentiell regulierten Proteinspots unter dem Aspekt der Liegezeit/Operationszeit, also in den Vergleichen SHAM140 vs. SHAM20 und IPC140 vs. IPC20. Die RSD lag durchschnittlich im Bereich von 20% - 30%.

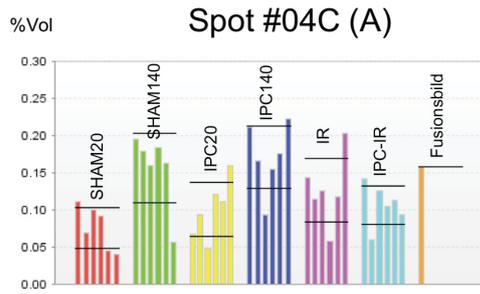
Tabelle 9 Vergleiche differentiell regulierter, Coomassie-gefärbter Proteinspots

Vergleich	Spot-#	Ratio
IPC20 vs. SHAM20	#06C	↑ 4,245
	#05C	↑ 4,951
IR vs. SHAM140	#06C	↑ 4,450
	#04C	↓ 0,623
IPC-IR vs. IPC140	#02C	↓ 0,400
	#03C	↓ 0,453
SHAM140 vs. SHAM20	#08C	↑ 1,430
	#09C	↑ 1,577
IPC140 vs. IPC20	#12C	↓ 0,484
	#01C	↓ 0,217
	#02C	↓ 0,287
	#04C	↑ 2,108
	#07C	↑ 1,351
	#09C	↑ 1,566
	#10C	↑ 1,543
	#11C	↓ 0,342

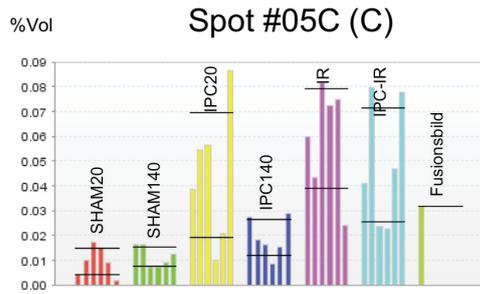
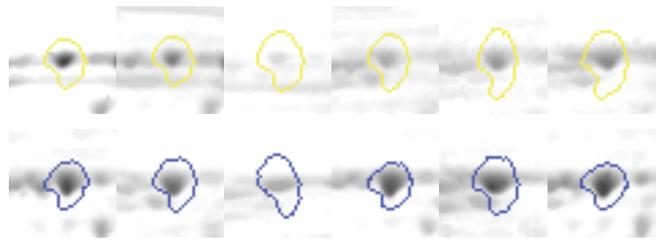
Die *Ratio* entspricht dem Mittelwert der *Ratios* der technischen Replikate A, B und C (SHAM20: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt $t = 20$ min, SHAM140: Scheinoperierte Tiere zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IPC20: Tiere mit IPC zum Zeitpunkt $t = 20$ min, IPC140: Tiere mit IPC zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IR: Tiere mit IR zum Zeitpunkt $t = 140$ min, IPC-IR: Tiere mit IPC gefolgt von IR zum Zeitpunkt $t = 140$ min).

Im Folgenden wurden in Abb. 15 die Spotalben der differentiell regulierten, Coomassie-gefärbten Proteinspots dargestellt. Die verschiedenen Gruppen wurden farblich gekennzeichnet. Rot ist die SHAM20-Gruppe, grün ist die SHAM140-Gruppe, gelb ist die IPC20-Gruppe, blau ist die IPC140-Gruppe, violett ist die IR-Gruppe und türkis ist die IPC-IR-Gruppe dargestellt. Es wurde jeweils ein repräsentatives, technisches Replikat dargestellt, dieses wurde in Klammern hinter den Spotnummern angegeben.

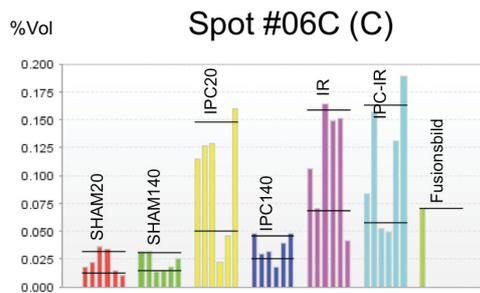
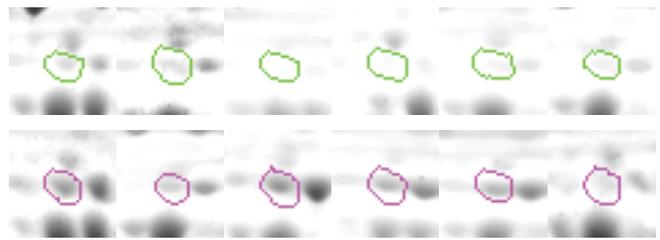




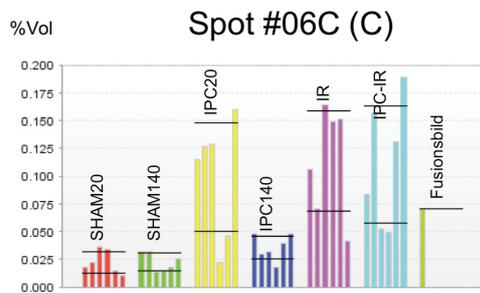
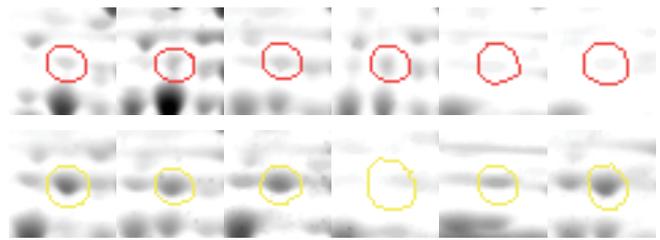
IPC140 vs. IPC20



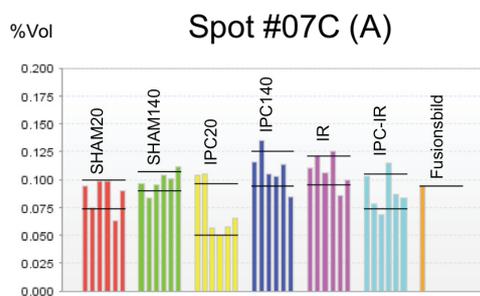
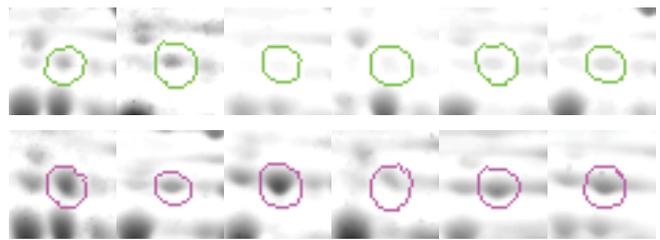
IR vs. SHAM140



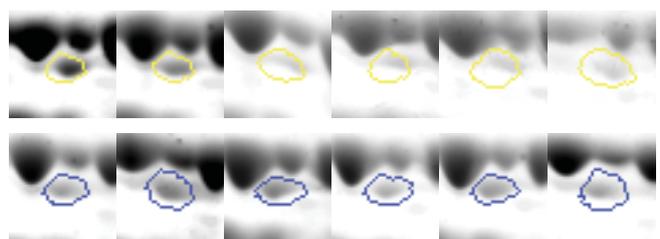
IPC20 vs. SHAM20

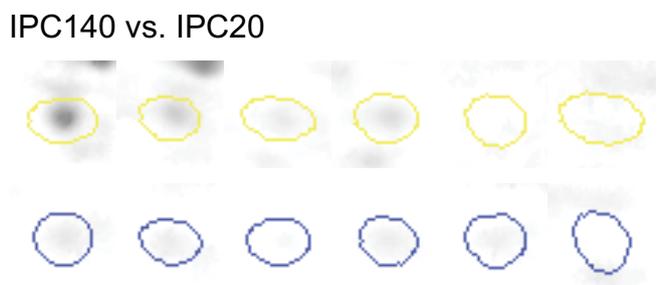
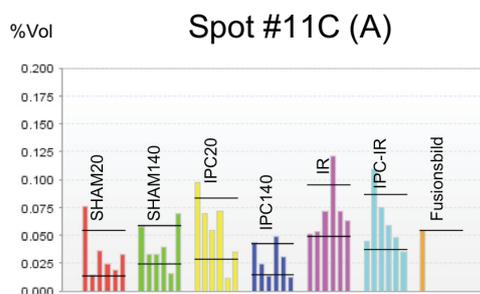
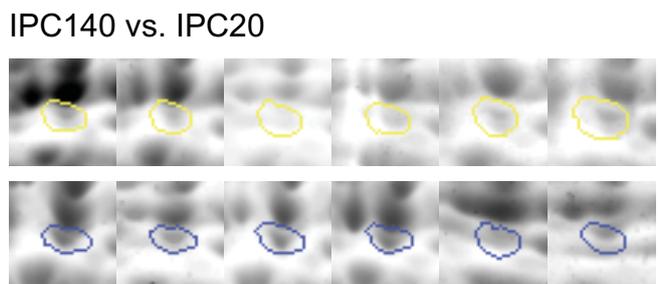
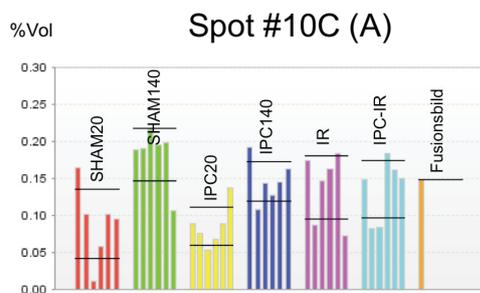
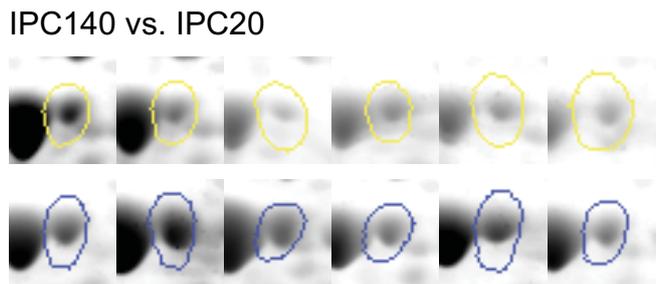
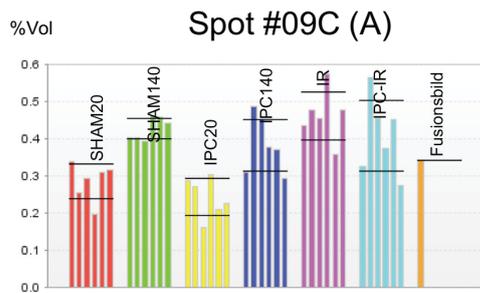
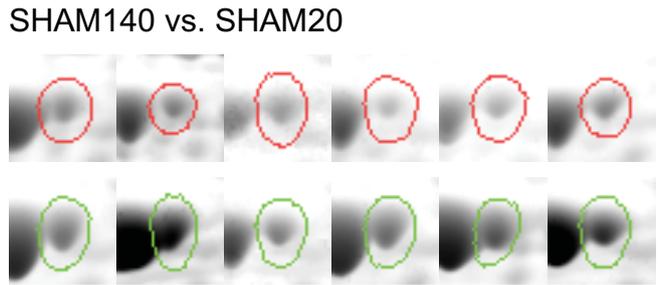
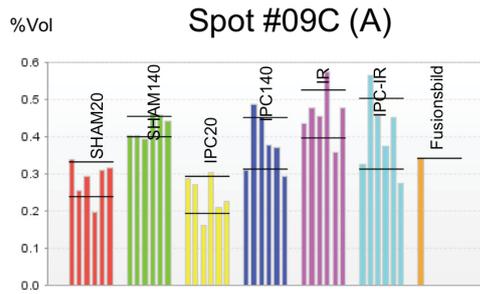
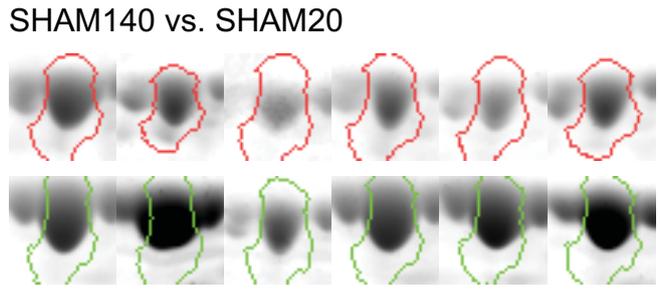
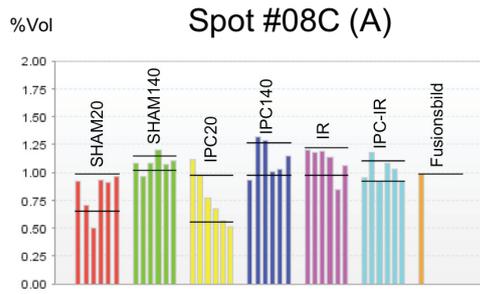


IR vs. SHAM140



IPC140 vs. IPC20





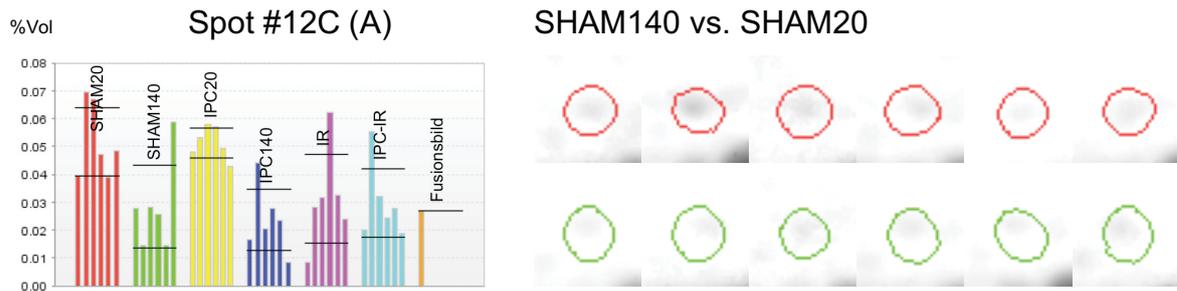


Abb. 15 **Expressionsprofile und Spotalben der differentiell regulierten Proteinspots auf den Coomassie-gefärbten Gelen.** Die SHAM20-Gruppe ist rot, die SHAM140-Gruppe ist grün, die IPC20-Gruppe ist gelb, die IPC140-Gruppe ist blau, die IR-Gruppe ist violett und die IPC-IR-Gruppe ist türkis markiert. In den Expressionsprofilen ist das normalisierte Spotvolumen (%Vol) für alle Gruppen dargestellt (schwarze Balken entsprechen Mittelwert \pm Standardabweichung). In den Spotalben ist der jeweilige Proteinspot in einem vergrößerten Bildausschnitt aller biologischen Replikate dargestellt. Hinter der Spot # ist in Klammern das jeweilige technische Replikat angegeben.

3.5 Identifizierte Proteine

Da die Proteinspots von geringer Abundanz waren, wurden zur Identifikation entsprechende Proteinspots mehrerer Gele *gepooled*. Von 21 differentiell regulierten, ProQ-DPS-gefärbten Proteinspots und von 12 differentiell regulierten, Coomassie-gefärbten Proteinspots konnten jeweils sechs Proteine identifiziert werden. Tabelle 10 listet die identifizierten Proteine nach Spotnummer sortiert auf (C: Coomassie, P: ProQ-DPS).

Tabelle 10 Übersicht der identifizierten, differentiell regulierten Proteine

Spot	Protein	Acc. No.	pI/MW [kDa]	Vergleich	Ratio
#01C	CPS1	P07756	6,00/164,58	IPC140 vs. IPC20	↓ 0,22
#02C	CPS1	P07756	6,00/164,58	SHAM140 vs. SHAM 20 IPC140 vs. IPC20	↓ 0,40 ↓ 0,29
#03C	5-Oxoprolinase	P97608	5,89/137,72	SHAM140 vs. SHAM20	↓ 0,45
#03P	eEF 2	P05197	6,41/95,28	IPC-IR vs. IPC140	↓ 0,43
#04C	eEF 2	P05197	6,41/95,28	IPC-IR vs. IPC140 IPC140 vs. IPC20	↓ 0,62 ↑ 2,11
#04P				IPC140 vs. IPC20	↑ 3,13
#06C	Serotransferrin	P12346	6,99/76,395	IPC20 vs. SHAM20 IR vs. SHAM140	↑ 4,25 ↑ 4,45
#08C	HSP60	P63039	5,91/60,91	SHAM140 vs. SHAM20	↑ 1,43
#09P	PKRL	P12928	6,45/62,2	IPC-IR vs. IPC140 IPC140 vs. IPC20	↓ 0,41 ↑ 2,22
#11P	PAH	P04176	5,77/51,82	IPC-IR vs. IPC140	↑ 2,34
#13P	NAD Kinase 2	Q1HCL7	5,88/48,11	IPC140 vs. IPC20	↓ 0,61
#16P	Regucalcin	Q03336	5,27/33,39	IPC140 vs. IPC20	↓ 0,50

Übersicht der identifizierten, differentiell regulierten ($p < 0,03$) Proteine mit *Accession Number* (Acc. No.), pI-Wert, Molekulargewicht (MW), Vergleich und *Ratio*. Die pI-Werte und das Molekulargewicht sind theoretische Werte, die auf der Webseite <http://www.uniprot.org> angegeben wurden. Die CPS1 und der eEF 2 wurden zweimal in zwei separaten Proteinspots gefunden und sind daher doppelt aufgeführt. Die *Ratio* entspricht dem arithmetischen Mittel der *Ratios* der technischen Replikate (A, B, C). P: ProQ-DPS gefärbt, C: Coomassie gefärbt, CPS1: Carbamoylphosphat-Synthase 1, eEF2: Elongationsfaktor 2, HSP60: 60 kDa Hitzeschockprotein, PKRL: Pyruvatkinase Isoenzyme R/L, PAH: Phenylalaninhydroxylase, NAD Kinase 2: Nicotinamidadenin-dinukleotid Kinase 2, Acc. No.: *Accession Number*. Spots die in den Coomassie bzw. ProQ-DPS gefärbten Gelen als differentiell reguliert detektiert wurden, sind mit einem „C“ bzw. „P“ gekennzeichnet.

Der Elongationsfaktor 2 war sowohl auf den Coomassie- als auch auf den ProQ-DPS-gefärbten Gelbildern differentiell reguliert. In beiden Fällen war er Teil einer Spotkette. Spotketten entstehen durch PTMs, welche Einfluss auf das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt der Proteine haben und somit die Auftrennung im 2D-Gel beeinflussen. Um besser einschätzen zu können, ob es sich um eine differentielle Expression oder eine differentielle Phosphorylierung handelte, wurden zwei weitere Proteinspots der Spotkette identifiziert

(eEF2.1 und eEF2.2). In beiden Fällen ließ sich der eEF2 massenspektrometrisch bestätigen (Abb. 16). Auf dem Coomassie-gefärbten Gelbild (A) war die gesamte eEF2-Spotkette zu sehen. Auf dem ProQ-DPS-gefärbten Gelbild (B) waren lediglich die phosphorylierten Isoformen des eEF2 zu sehen (eEF2- und eEF2.3-Proteinspot).



Abb. 16 **Identifizierte Isoformen des Elongationsfaktor 2 (eEF2).** (A) zeigt die Coomassie-gefärbte Spotkette des eEF2. (B) zeigt die ProQ-DPS-gefärbte Spotkette des eEF2. Mittels Massenspektrometrie wurden alle vier markierten Isoformen (eEF2, eEF2.1, eEF2.2, eEF2.3) als Elongationsfaktor 2 identifiziert. Das ProQ-DPS-gefärbte Gelbild zeigt, dass nur die Proteinspots eEF2 und eEF2.3 phosphoryliert sind.

Um die Regulation des eEF2 besser einschätzen zu können, sind in Tabelle 11 die Spotvolumina, *Ratios* und *p*-Werte der identifizierten Isoformen für den Vergleich IPC140 vs. IPC20 aufgeführt. Lediglich der eEF2-Proteinspot war in der Coomassie-Färbung und der ProQ-DPS differenziell ($p \leq 0,03$) hochreguliert. Der eEF2.3-Proteinspot lag für beide Färbungen im A-Replikat mit $p = 0,291$ (Coomassie) bzw. $p = 0,067$ (ProQ-DPS) unter dem Signifikanzniveau. Auf die Interpretation wird in der Diskussion unter 4.3 genauer eingegangen.

Tabelle 11 Spotvolumina der verschiedenen Isoformen des eEF2 im Vergleich IPC140 vs. IPC20

	Spot	IPC20 [%Vol]	IPC140 [%Vol]	Ratio	p (A)	p (B)	p (C)
Coomassie	eEF2	0,087	0,179	2,108	0,018	<0,001	0,001
	eEF2.1	0,091	0,109	1,226	0,739	0,09	0,13
	eEF2.2	0,18	0,163	0,933	0,062	0,221	0,284
	eEF2.3	0,099	0,149	1,514	0,291	0,012	0,02
ProQ-DPS	eEF2	0,292	0,898	3,041	0,003	<0,001	0,013
	eEF2.3	0,123	0,308	2,567	0,067	0,002	0,028

Dargestellt sind die Spotvolumina der verschiedenen Isoformen des eEF2 für den Vergleich IPC140 vs. IPC20. Differentiell reguliert ($p \leq 0,03$) war der eEF2-Spot auf den Coomassie- und ProQ-DPS-gefärbten Gelbildern. Für die Spotvolumina der IPC20- und IPC140-Gruppe sowie die *Ratio* wurde das arithmetische Mittel der Spotvolumina und *Ratios* der drei technischen Replikate (A, B, C) gebildet.

4 Diskussion

Es war das Ziel der Arbeit, den Einfluss einer Ischämie und Reperfusion sowie einer ischämischen Präkonditionierung auf das zytosolische Subproteom der Leber zu untersuchen. Hierzu wurde die 2D-Gelelektrophorese mit der Massenspektrometrie kombiniert. Die Proteine wurden mit einer spezifischen Phosphatfärbung und einer Färbung, die die gesamten Proteine anfärbt, markiert und anschließend identifiziert. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- Eine IPC induzierte bereits nach 20 min eine vermehrte Expression von Serotransferrin (IPC20 vs. SHAM20, *Ratio* 4,25). Eine IPC-induzierte differentielle Phosphorylierung konnte nicht detektiert werden.
- Die Operationszeit hatte wesentlichen Einfluss auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Leberproteine (SHAM140 vs. SHAM20 und IPC140 vs. IPC20). Unter anderem wurden die 5-Oxoprolinase und die CPS1 vermindert und der eEF2 und das HSP60 vermehrt exprimiert. Der eEF2 und die PKRL wurden vermehrt phosphoryliert und die NAD Kinase 2 und Regucalcin dephosphoryliert. Sechzehn weitere Proteine wurden reguliert, jedoch nicht identifiziert (#01P, #02P, #05P, #06P, #07P, #08P, #14P, #15P, #19P, #20P, #21P, #07C, #09C, #10C, #11C, #12C).
- Durch eine IR der Leber wurde Serotransferrin vermehrt exprimiert (IR vs. SHAM140, *Ratio* 4,45). Ein weiterer Coomassie-gefärbter und ein ProQ-DPS-gefärbter Proteinspot wurden durch die IR reguliert, konnten jedoch nicht identifiziert werden (Spot #05C und #21P).
- Eine IR in Kombination mit IPC (IPC-IR vs. IPC140) führte zu einer verminderten Expression und Phosphorylierung des eEF2 (*Ratio* 0,62 bzw. 0,43), zu einer vermehrten Phosphorylierung der Phenylalaninhydroxylase (*Ratio* 2,34) und zu einer verminderten Phosphorylierung der PKRL (*Ratio* 0,41). Fünf weitere differentiel regulierte Phosphoproteinspots konnten detektiert, jedoch nicht identifiziert werden (#10P, #12P, #17P, #18P, #21P).
- IPC in Kombination mit IR führte zu keiner signifikanten Regulation des zytosolischen Subproteoms (IPC-IR vs. IR).

4.1 Reduktion des Ischämie- und Reperfusionsschadens der Leber durch IPC

Mehrere Autoren beschrieben bereits, dass eine ischämische Präkonditionierung einen hepatischen IR-Schaden reduziert (70,76–80). Als Marker für einen akuten hepatozellulären Schaden wurden in den meisten Studien die Transaminasen AST und ALT verwendet. Eine Reduktion von Apoptose und Nekrose der Leber konnte ebenfalls gezeigt werden (77). Für die vorliegende Studie diente die Bestimmung der Transaminasen als formaler Nachweis, dass die ischämische Präkonditionierung zu einer Hepatoprotektion geführt hatte.

Der bereits beschriebene protektive Effekt der hepatischen IPC konnte damit bestätigt werden. Um die Pathophysiologie dieses Phänomens besser zu verstehen, wurde das zytosolische Subproteom von scheinoperierten Tieren mit dem von IPC-behandelten Tieren verglichen.

4.2 Einfluss der reinen IPC auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine

Der Vergleich von SHAM- und IPC-Tieren zeigte nach 20 min eine 4,3-fache Hochregulation von Serotransferrin. 140 min nach Beginn der IPC gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den IPC- und SHAM-Tieren (IPC140 vs. SHAM140). Regulationen des zytosolischen Phosphoproteoms waren nicht zu detektieren. Serotransferrin ist ein Glykoprotein des Eisenstoffwechsels, welches hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. Es ist in der Lage zwei Eisenionen zu binden (67) und transportiert Eisen im Serum. Da freies Eisen eine beschleunigte Lipidperoxidation und die Bildung des Hydroxyl-Radikals vermittelt (81), verstärkt es den ROS-induzierten IR-Schaden. Eine vermehrte Expression des eisenbindenden Serotransferrins ließ sich als IPC-induzierter, antioxidativer Mechanismus der Leber interpretieren und wäre der späten Phase der IPC zuzuordnen. Eine IR führte ebenfalls zu einer Hochregulation von Serotransferrin (IR vs. SHAM140, *Ratio* 4,5). Eine Ischämie-/Hypoxie-induzierte Expression von Serotransferrin wurde bereits für Zellen des Innenohrs (das Corti-Organ) auf mRNA-Ebene beschrieben (82). Für die Leber wurde bislang kein Zusammenhang zwischen IPC / IR und der Expression von Serotransferrin beschrieben. Die Analyse von zwei, sich überlappenden pH-Bereichen der zytosolischen Fraktion (durch S. Weidhaas), hatte ebenfalls keine signifikante Regulation detektieren können. Es wären somit Bestätigungstests z.B. mittels Western blot notwendig, um das Ergebnis zu verifizieren. Die vermehrte Expression von Serotransferrin könnte einen antioxidativen Mechanismus der hepatischen IPC darstellen. Ob Serotransferrin in dieser Untersuchung einen Anteil an der IPC-induzierten Hepatoprotektion hat, ist noch zu klären.

4.3 Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Operation auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine

Die meisten Veränderungen des Proteoms und des Phosphoproteoms wurden im zeitlichen Verlauf der Operation, also zwischen SHAM140 vs. SHAM20 und IPC140 vs. IPC20 detektiert. Auf den ProQ-DPS-gefärbten Gelen wurden insgesamt 18 und auf den Coomassie-gefärbten Gelen 12 Proteinspots differentiell reguliert. Hiervon konnten die CPS1, die 5-Oxoprolinase, das 60 kDa Hitzeschockprotein, der eukaryote Elongationsfaktor 2, die Pyruvatkinase Isoenzyme R/L, die NAD-Kinase und Regucalcin massenspektrometrisch identifiziert werden. Diese Proteine werden im Folgenden genauer charakterisiert und funktionell eingeordnet.

Die CPS1 wurde in zwei benachbarten Proteinspots identifiziert und im Vergleich IPC140 vs. IPC20 herunterreguliert (Spot#01C, *Ratio* 0,22 und Spot#02C, *Ratio* 0,29). Im Vergleich SHAM140 vs. SHAM20 wurde nur einer der beiden Spots herunterreguliert (Spot#02C, *Ratio* 0,4). Die CPS1 katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Harnstoffzyklus, wird nukleär kodiert und posttranslational in das Mitochondrium importiert (83). Xu *et al.* detektierten eine reduzierte Expression der CPS1 im Vergleich IR vs. SHAM (*Ratio* 0,55/0,51) (64). Genaue Angaben zu den Zeitpunkten der Blut- und Gewebeentnahme der SHAM-Tiere wurden bei Xu *et al.* jedoch nicht gemacht, sodass offenbleibt, ob die CPS auch hier durch den zeitlichen Verlauf der OP reguliert wurde. Betrachtet man die Expressionsprofile der CPS1, zeigten sich nach 140 min in allen Gruppen (SHAM140, IPC140, IR, IPC-IR) eine deutlich verminderte, jedoch nicht in allen Vergleichen signifikant verminderte Expression. Die Inhibition des Harnstoffzyklus könnte als Ausdruck eines reduzierten Metabolismus der Leber interpretiert werden.

Die 5-Oxoprolinase wurde im Vergleich SHAM140 vs. SHAM20 auf das 0,45-fache herunterreguliert (#03C). Sie ist eine Hydrolase, welche die Reaktion von $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + 5\text{-Oxo-L-Prolin} \rightarrow \text{ADP} + \text{Phosphat} + \text{Glutamat}$ katalysiert (84). Sie ist unter anderem am gamma-Glutamylzyklus beteiligt, also an der Bereitstellung von Glutathion (85). In der Leber dient Glutathion als Antioxidans zum Schutz vor ROS und zur Konjugation von schädlichen Stoffen während der Phase-II-Reaktion der Biotransformation (67). Weniger 5-Oxoprolinase könnte somit zu einer reduzierten Bereitstellung von Glutathion und somit zu mehr oxidativem Stress führen. Im zeitlichen Verlauf der Operation der IPC-Tiere (IPC140 vs. IPC20) war die 5-Oxoprolinase nicht signifikant reguliert, sodass der zeitliche Verlauf der OP alleine scheinbar

nicht zu einer Regulation des Enzyms führte. Sie wurde im Zusammenhang mit der hepatischen IPC oder IR bislang noch nicht beschrieben.

Das 60 kDa Hitzeschockprotein (HSP60) wurde im Vergleich SHAM140 vs. SHAM20 mit der *Ratio* 1,43 hochreguliert (#08C). Da HSP60 in einer Spotkette vorliegt, ist anhand der 2D-Gelbilder nicht zu sagen, ob es sich um eine differentielle Expression oder Modifikation handelt. HSP60 ist ein Protein der Chaperonfamilie, welches hauptsächlich im Mitochondrium (80-85%) und Zytosol lokalisiert ist (86,87). Es setzt sich aus sieben Untereinheiten zu einer fassähnlichen Struktur zusammen und ist an der Faltung von neu synthetisierten Proteinen beteiligt. Hitzeschockproteine werden im Rahmen einer Stressreaktion (z.B. Hitze, Ischämie) vermehrt exprimiert (88). An Kardiomyozyten konnte eine ischämieinduzierte Expression von HSP60 nachgewiesen werden (89,90). Im Rahmen dieser Arbeit war HSP60 im zeitlichen Verlauf der Operation nur bei den SHAM-Tieren hochreguliert. Wider Erwarten, wurde HSP60 durch den Stimulus einer Ischämie nicht hochreguliert. Die vermehrte Expression von HSP60 konnte durch S. Weidhaas bestätigt werden. Dieser hatte sowohl bei den SHAM- als auch bei den IPC-Tieren eine Hochregulation detektiert. Obwohl HSP60 zum größeren Anteil im Mitochondrium lokalisiert ist (86,87), konnte bei der Analyse der mitochondrialen Fraktion keine differentielle Regulation detektiert werden (T. Strahl).

Der eukaryote Elongationsfaktor 2 (eEF2) wurde auf den Coomassie gefärbten Gelbildern im Vergleich IPC140 vs. IPC20 mit der *Ratio* 2,11 hochreguliert (#04C). Auf den ProQ-DPS-gefärbten Gelbildern wurde der gleiche Proteinspot (#04P) im Vergleich IPC140 vs. IPC20 mit der *Ratio* 3,13 hochreguliert. Der Elongationsfaktor 2 ist ein GTP-bindendes Protein der Translation, welches in die Translokation am Ribosom vermittelt. Er wird durch spezifische eEF2-Kinasen (eEF2K) phosphoryliert und dadurch deaktiviert (91,92). Die Hochregulation des phosphorylierten Proteinspots lässt sich somit als vermehrte Deaktivierung und Reduktion der Proteinsynthese interpretieren. Der eEF2 selbst und die Regulation der Translation wurde in Studien zur zerebralen IPC und IR untersucht (93–95). In Bezug auf die hepatische Ischämie und Reperfusion wurde der eEF2 bislang nicht beschrieben.

Die Phosphorylierung des eEF2 führte zu einem *pH-shift* in den sauren Bereich und erhöhte das Molekulargewicht um 80 Da. Insbesondere der *pH-shift* beeinflusste das Auftrennungsverhalten der neu entstandenen Isoform während der 2D-Gelelektrophorese. Diese stellte sich als separater Proteinspot im PAA-Gel dar. Eine Modifikation führte somit zu einer Regulation des ProQ-DPS als auch des Coomassie gefärbten Proteinspots. Da der eEF2-Proteinspot Teil einer Spotkette war, identifizierten wir neben dem differentiell regulierten

eEF2-Proteinspot weitere Proteinspots der Spotkette mittels MS (Abb. 16). Alle vier Proteinspots erwiesen sich als Elongationsfaktor 2.

Threonin 57 und Threonin 59 sind als *Phosphosites* des eEF2 (Ratte) vorbeschrieben (96). Ob diese auch den *Phosphosites* des eEF2- und eEF2.3-Proteinspots entsprachen, konnte massenspektrometrisch nicht geklärt werden. Hierfür wäre eine weitere Aufbereitung, z.B. durch Anreicherung von Phosphopeptiden notwendig gewesen. Die phosphorylierten Isoformen (eEF2, eEF2.3) hatten in der IPC140-Gruppe im Vergleich zur IPC20-Gruppe zugenommen (Tabelle 11). Die nicht-phosphorylierten Proteinspots (eEF2.1 und eEF2.2) lagen mit ihrer *Ratio* nahe eins und waren außerhalb des Signifikanzniveaus. Ob es sich um eine differentielle Phosphorylierung oder um eine differentielle Expression der phosphorylierten Isoform handelte, war anhand der Spotvolumina und *Ratios* nicht eindeutig zu differenzieren (Tabelle 11). Abb. 16 verdeutlicht, dass neben den vier identifizierten Isoformen des eEF2 der Spotkette noch weitere Isoformen angehörten. Vermutlich handelte es sich hierbei um weitere Isoformen des eEF2, die jedoch aufgrund ihrer geringen Abundanz nicht identifiziert wurden und auch in der Auswertung mittels Delta 2D nicht differentiell reguliert waren.

Der eEF2 wird durch die eEF2 Kinase reguliert, die ihrerseits durch Phosphorylierungen mehrerer *Phosphosites* in ihrer Aktivität reguliert wird (97). Abb. 17 zeigt acht Signaltransduktionskaskaden, die in die Regulation der eEF2 Kinase eingreifen. Die Aktivität der eEF2 Kinase wird unter anderem durch die Phosphorylierung von fünf Serinen reguliert (97).

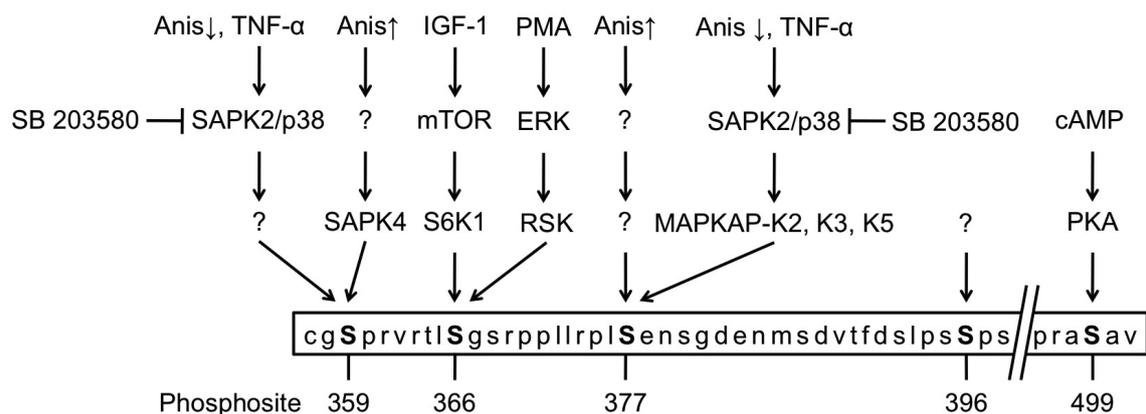


Abb. 17 **Regulation der eEF2 Kinase durch Phosphorylierung von fünf *Phosphosites* (97).** (Anis: Anisomycin, mTOR: Ziel des Rapamycins im Säugetier, ERK: *Extrazellulär-Signal regulierte Kinase*, cAMP: *Cyclisches Adenosinmonophosphate*, PKA: Proteinkinase A, PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat, IGF-1: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1, TNF- α : *Tumor necrosis factor- α* , SAPK2: Stress-aktivierte Proteinkinase 2, MAPKAP2: *Mitogenaktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2*, SB203580: Selektiver Inhibitor des p38-MAPK Signalwegs)

Einige der involvierten Proteinkinasen wurden bereits von anderen Autoren im Zusammenhang mit der IPC beschrieben. Hierzu zählen die cAMP-abhängigen Proteinkinasen und die p38-MAPK (25,36,46). Bereits eine zehnmütige Ischämie führte zu einer signifikanten Aktivierung der Adenosinmonophosphat-abhängigen Proteinkinasen (AMPK) und Reduktion der hepatischen Proteinsynthese (98).

Die Pyruvatkinase Isoenzym R/L (PKRL) wurde auf den ProQ-DPS gefärbten Gelbildern im Vergleich IPC140 vs. IPC20 mit einer *Ratio* von 2,2 hochreguliert (#09P). Sie katalysiert einen der drei geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Glykolyse. ATP, Alanin und Phosphorylierungen an drei *Phosphosites* hemmen die PKRL. Fructose-1,6-bisphosphat aktiviert die PKRL. Eine Phosphorylierung wird unter anderem durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) vermittelt (99) und führt zu einer geringeren Affinität zu Fructose-1,6-bisphosphat. Eine vermehrte Phosphorylierung entspräche somit einer Hemmung der Glykolyse im zeitlichen Verlauf der IPC-Tiere. Bei den SHAM-Tieren ließ sich keine differentielle Regulation der PKRL im zeitlichen Verlauf detektieren. Durch andere Autoren wurde die PKRL bislang nicht im Zusammenhang mit der hepatischen IPC beschrieben. Bei Betrachtung der Expressionsprofile (Abb. 13) fiel auf, dass die PKRL vor allem unmittelbar nach einer Ischämie und Reperfusion (IPC20, IR, IPC-IR) weniger phosphoryliert und somit in ihrer Aktivität gesteigert war. Nach längerer Perfusion (SHAM20, SHAM140, IPC140) war die PKRL im Durchschnitt vermehrt phosphoryliert und somit deaktiviert. Eine reversible Phosphorylierung scheint also an der ischämieinduzierten Regulation der Glykolyse beteiligt zu sein. Eine vom Sauerstoffpartialdruck abhängige Expression der PKRL wurde auf mRNA- und Protein-Level bereits nachgewiesen (100).

Die NAD Kinase 2 wurde auf den ProQ-DPS gefärbten Gelbildern im Vergleich IPC140 vs. IPC20 mit einer *Ratio* von 0,61 herunterreguliert (#13P). Eine differentielle Regulation erfolgte im zeitlichen Verlauf der SHAM-Tiere (SHAM140 vs. SHAM 20) nicht. Die NAD Kinase 2 ist ein nukleär kodiertes, mitochondriales Enzym, welches Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) durch Phosphorylierung in Nicotinamidadenindinukleotid-Phosphat (NADP⁺) überführt. Dass die NAD Kinase 2 im zytosolischen Kompartiment identifiziert wurde, ist einerseits durch den zytosolischen Syntheseort und andererseits durch eine nicht reine, subzelluläre Fraktionierung begründet. Für die NAD Kinase 2 der Ratte sind mehrere *Phosphosites* vorhergesagt und zum Teil nachgewiesen (101,102). Welche Funktionen diesen *Phosphosites* zukommen und welche Bedeutung eine verminderte Phosphorylierung im zeitlichen Verlauf der IPC-Tiere haben könnte, ist bis dato nicht bekannt. Die NAD Kinase 2

ist an zahlreichen Redoxreaktionen in den Mitochondrien beteiligt (67), sodass dessen Regulation im Rahmen des ROS-vermittelten oxidativen Stresses zu vermuten wäre (103,104).

Regucalcin (RGN) wurde auf den ProQ-DPS gefärbten Gelbildern im Vergleich IPC140 vs. IPC20 mit der *Ratio* 0,5 herunterreguliert (#16P). Es handelt sich um ein Calcium-bindendes Protein welches in der Leber an der Regulation der Calciumhomeostase beteiligt ist (105). *Phosphosites* sind für Serin 46 (101) und Serin 268 (101,106) beschrieben. Die Funktionen dieser Phosphorylierungen sind bis dato nicht bekannt und konnten auch im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Welche biologische Bedeutung eine verminderte Phosphorylierung von RGN im zeitlichen Verlauf der IPC-Tiere zukommt, bleibt somit unklar. Im Zusammenhang mit der hepatischen IPC wurde RGN bislang nicht beschrieben. Da die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration eine Rolle an der Entstehung des ischämieinduzierten Schadens spielt (4), wäre eine Regulation durch die IPC / Operationszeit denkbar.

Die meisten Regulationen konnten zeitlichen Verlauf der Operation, also zwischen der SHAM140 vs. SHAM20- und der IPC140 vs. IPC20-Gruppe detektiert werden. Die verminderte Expression der CPS1 und 5-Oxoprolinase sowie die vermehrte Phosphorylierung des eEF2 und der PKRL lassen auf eine Hemmung des hepatischen Stoffwechsels schließen. Die vermehrte Expression von HSP60 und die verminderte Phosphorylierung der NAD-Kinase und RGN lassen sich einer hepatischen Stressreaktion, z.B. durch ROS, zuordnen. Als Trigger dieser Regulationen wären sowohl die Operation selbst, die Narkose mittels Barbiturat (Pentobarbital) (107,108) als auch die Nahrungskarenz der Tiere (109) denkbar.

4.4 Einfluss einer Ischämie und Reperfusion mit und ohne IPC auf die Expression und Phosphorylierung zytosolischer Proteine

Der Einfluss einer Ischämie und Reperfusion wurde im Vergleich der IR- mit den SHAM-Tieren, sowie in Kombination mit einer IPC (IPC-IR vs. IPC140) analysiert. Wie bereits unter 4.2 erwähnt, induzierte eine IR eine 4,5-fachen Hochregulation von Serotransferrin (IR vs. SHAM140). Eine 60-minütige Ischämie und Reperfusion führte somit zu einer vergleichbaren Hochregulation wie die 10-minütige Ischämie und Reperfusion (*Ratio* 4,25 bzw. 4,45). Zu klären wäre, ob die frühe Induktion des antioxidativen Serotransferrins vor einer längeren IR zu einer zusätzlichen Hepatoprotektion beiträgt oder ob dieser Effekt auch durch die 60-minütige IR selbst zu tragen kommt.

Ein weiterer Coomassie-gefärbter (#05C, *Ratio* 5,0) und ein ProQ-DPS-gefärbter Proteinspot (#21P, *Ratio* 2,7) wurden durch die IR hochreguliert. Eine Identifikation mittels Massenspektrometrie war jedoch aufgrund zu geringer Abundanz nicht möglich.

Der Einfluss der IR in Kombination mit IPC führte auf den Coomassie-gefärbten Gelen zu einer Herunterregulation des eEF2 (#04C, *Ratio* 0,62). Die Analyse der ProQ-DPS-gefärbten Gele ergab insgesamt acht differentiell regulierte Proteinspots von denen drei identifiziert wurden. Der benachbarte Spot #03P, welcher einer phosphorylierten Isoform des eEF2 entsprach, war mit der *Ratio* 0,43 herunterreguliert. Es war nicht eindeutig zu unterscheiden, ob es sich um eine differentielle Dephosphorylierung und somit um eine Aktivierung des eEF2 oder um eine verminderte Expression handelte.

Die PKRL (#09P) wurde auf den ProQ-DPS-gefärbten Bildern im Vergleich IPC-IR vs. IPC140 herunterreguliert (*Ratio* 0,4). Eine reduzierte Phosphorylierung entspräche einer gesteigerten Aktivität des Enzyms und wäre durch einen gesteigerten anaeroben Energiebedarf während der IR zu erklären. Durch die alleinige IR (IR vs. SHAM) wurde die PKRL nicht signifikant reguliert, sodass die vorherige IPC ebenfalls Einfluss zu haben scheint.

Die Phenylalaninhydroxylase (PAH) wurde auf den ProQ-DPS-gefärbten Gelbildern im Vergleich IPC-IR vs. IPC140 hochreguliert (#11P, *Ratio* 2,3). Die PAH ist ein zytosolisches Enzym, welches die Hydroxylierung von L-Phenylalanin zu Tyrosin katalysiert. Die PAH wird allosterisch durch Phenylalanin und Phosphorylierung an Serin 16 (cAMP-abhängige Proteinkinase) aktiviert (110,111). Warum eine IR zu einer Aktivierung der PAH führt ist unklar und wurde im Zusammenhang mit der hepatischen IPC und IR bislang nicht beschrieben.

Die Ischämie und Reperfusion hatte zu einer Regulation von insgesamt drei Proteinen geführt. In Kombination mit IPC wurden neun Proteine differentiell reguliert. Die meisten Regulationen wurden mit der ProQ-DPS detektiert und betrafen somit zytosolische Phosphoproteine. Der Einfluss einer hepatischen IR auf posttranslationale Proteinmodifikationen wurde bislang nicht untersucht.

4.5 Kritik an der Methodik

4.5.1 Grenzen der 2D-Gelelektrophorese und der Proteinfärbungen

Das zytosolische Proteom der verschiedenen Interventionsgruppen wurde mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit der ProQ-DPS und der Coomassie-Färbung sequentiell

gefärbt. Auf den Coomassie gefärbten Gelbildern konnten zwischen 463 und 483 Proteinspots detektiert werden. Ein häufig genannter Kritikpunkt der 2D-Gelelektrophorese ist die eingeschränkte Möglichkeit, Proteine geringer Abundanz darzustellen (112,113). Trotz hochauflösender Auftrennung der Probe, wurden Proteine, die unterhalb der Sensitivität der Färbung lagen, nicht detektiert. Ähnliche Studien konnten an einem Gesamtzelllysat der Leber bis zu 1200 Proteinspots detektieren (64,65). Grund hierfür waren deutlich größere PAA-Gele und zum Teil auch die Verwendung anderer Färbungen (z.B. Fluoreszenzfärbungen). Entscheidend für diese Studie war, dass beide Färbungen mit der Massenspektrometrie kompatibel waren und dass relativ viele Interventionsgruppen sowie biologische und technische Replikate verwendet wurden. Ein leichtes *Handling* und kurze Elektrophoresezeiten waren entscheidend. Die kolloidale Coomassie-Färbung war schnell anwendbar, kostengünstig und hatte eine Sensitivität von ca. 5 ng Protein pro Bande (1D-Gel) (75). Die Sensitivität der ProQ-DPS war von der Anzahl der phosphorylierten *Phosphosites* abhängig. Für Ovalbumin, einem zweifach phosphorylierten Protein, lag die Nachweisgrenze bei ca. 6 ng Protein pro Bande (1D-Gel). Je mehr Gesamtprotein aufgetrennt wurde, desto mehr Proteine geringer Abundanz konnten dargestellt werden. Auf der anderen Seite war die Kapazität der 2D-Gelelektrophorese begrenzt und eine größere Proteinmenge führte zu einer schlechteren Abgrenzbarkeit der Proteinspots auf dem 2D-Gelbild. Es musste ein Kompromiss aus aufgetragener Proteinmenge und Trennschärfe der Proteinspots gefunden werden. Für die verwendeten PAA-Gele lag die optimale Proteinmenge bei 150 µg (Abb. 19). Um die Komplexität der Probe vor der Auftrennung zu reduzieren, war eine Präfraktionierung notwendig.

Zu den Verfahren der Präfraktionierung konnten die subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation sowie die Wahl mehrerer, sich überlappender pH-Bereiche (untersucht durch S. Weidhaas und T. Strahl) gezählt werden. Durch sehr enge pH-Bereiche von einer Einheit pro 17 cm-IPG-Streifen konnten Hoving *et. al* Proteine mit einer Häufigkeit von ca. 300 Kopien pro Zelle detektieren (112). Eine komplexe, zytosolische Probe in ähnlicher Weise zu fraktionieren, wäre in einem primär globalen Ansatz nicht durchführbar gewesen. Chromatographische Anreicherungsverfahren zur Präfraktionierung, erschienen aufgrund des Proteinverlustes für eine quantitative, vergleichende Studie nicht geeignet (114).

Durch differentielle Zentrifugation konnte die Anzahl unterschiedlicher Proteine auf die einer subzellulären Fraktion reduziert werden (115). Dass es durch die Zentrifugationsschritte zu keiner reinen Trennung der subzellulären Kompartimente kam, zeigten zum einen die Western blots gegen Fraktionen-spezifische Proteine (6 Anhang) und zum anderen die identifizierten

Proteine selbst. Die mitochondriale Carbamoylphosphat-Synthase, die mitochondriale NAD Kinase 2 und das mitochondriale 60 kDa Hitzeschockprotein waren Proteine, die in der zytosolischen Fraktion identifiziert wurden, jedoch für das mitochondriale Kompartiment vorbeschrieben sind. Die NAD-Kinase 2 und die CPS sind nukleär kodiert, werden somit im Zytosol synthetisiert und erst nach der Translation in die Mitochondrien importiert. Sie kommen somit auch im zytosolischen Kompartiment vor.

Durch Protein-Präfraktionierung wurde, auf Kosten der Betrachtung eines kleineren Subproteoms, die Komplexität der Proteinprobe reduziert. Dies könnte der Grund dafür gewesen sein, dass z.B. im Vergleich der IPC-IR vs. IR-Gruppe weniger differentiell regulierte Proteine detektiert wurden, als in anderen hepatischen IPC-Studien (64). Andererseits hatte die Auswertung der ProQ-DPS-gefärbten Gelbilder viele differentiell regulierte Proteinspots von so geringer Abundanz detektiert, dass die Identifikation mittels MS nicht möglich war. Ein Lösungsansatz sind präparative Gele (Auftragen von großen Proteinmengen) (116).

4.5.2 Grenzen der *Phosphoproteomics*

Das zytosolische Phosphoproteom der Leber wurde unter dem Aspekt einer IR und einer IPC quantitativ erfasst und differentiell phosphorylierte Proteine mittels MS identifiziert. Insbesondere die Phosphatfärbung sowie die *Phosphoproteomics* unterliegen einigen Limitierungen.

Die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist ein hoch dynamisches System (117–119). Es mussten unmittelbar nach Entnahme des Lebergewebes Phosphataseinhibitoren eingesetzt werden, um eine „Momentaufnahme“ des jeweiligen Interventionszeitpunktes festzuhalten. Da jedoch manche Phosphorylierungen chemisch labil sind (120), wurde ein Teil Proteinmodifikationen vermutlich auch mit Phosphataseinhibitoren nicht erfasst.

Der Phosphorylierungsgrad eines Proteins variiert ebenfalls stark. So gibt es Phosphoproteine wie z.B. α -Casein, die nahezu vollständig phosphoryliert sind und andere Proteine, wie z.B. der eEF2, die nur zu einem gewissen Anteil ein- oder mehrfach phosphoryliert sind (121,122). Je nach Anzahl der *Phosphosites* führt die Phosphorylierung zu einer heterogenen Gruppe von Phosphoproteinen unterschiedlicher chemischer und biologischer Eigenschaften. Anzunehmen war des Weiteren, dass Phosphoproteine der Signaltransduktion in geringer Konzentration vorlagen und dass die Änderung des Phosphorylierungsgrades durch einen bestimmten

Stimulus ebenfalls gering ausfiel (117,122). Diese Änderung mit der Phosphatfärbung zu detektieren und zu quantifizieren scheint in vielen Fällen nicht möglich zu sein.

Um Phosphoproteine detektieren zu können, gibt es verschiedene Methoden. Die wahrscheinlich älteste ist die Markierung von Phosphoproteinen mittels Radioisotopen des Phosphors (^{32}P , ^{33}P) (133). Vorteil ist die hohe Sensitivität dieser Methode. Nachteil ist, dass sie im *in vivo* Tiermodell nicht anwendbar ist. Eine weitere sehr sensitive Methode ist die Detektion von Phosphoproteinen mittels Western blot und phosphatspezifischer Antikörper. Einschränkend sind im Wesentlichen die Antikörper selbst. Während es sehr spezifische Anti-Phosphotyrosinantikörper gibt, gibt es nur Sequenz-spezifische Antikörper gegen Phosphoserin und Phosphothreonin (123). Problematisch ist dies vor allem, wenn man bedenkt, dass das Phosphorylierungsverhältnis der Aminosäuren genau umgekehrt eingeschätzt wird (Serin: Threonin: Tyrosin = 1800: 200: 1) (134–136). Eine weitere, sehr einfach anwendbare Methode ist die direkte Färbung von Phosphoproteinen mit einer geeigneten Färbung. Die ProQ-DPS ist die derzeit am meisten verbreitete Phosphatfärbung, welche Phosphatgruppen unabhängig von der phosphorylierten Aminosäure detektiert. Kritikpunkte sind vor allem die eingeschränkte Sensitivität und zum Teil auch Spezifität für Phosphoproteine. Die alkalische Dephosphorylierung von Phosphoproteinen (Abb. 9) hat gezeigt, dass es zu einem unspezifischen Anfärben/Hintergrundfärben des nicht phosphorylierten BSA kam. Des Weiteren war Ovalbumin (zwei *Phosphosites* an Serin 69 und Serin 345) nach Dephosphorylierung nicht vollständig entfärbt. Dies entsprach am ehesten einer unvollständigen Dephosphorylierung durch die AP. Eine Wiederholung der Dephosphorylierung mit vorheriger vollständiger Denaturierung des Ovalbumins hätte unter Umständen klären können, ob es sich um eine Unspezifität der ProQ-DPS oder eine unvollständige Dephosphorylierung gehandelt hat. Ein großer Vorteil der ProQ-DPS liegt in der Reversibilität der Färbung. Hierdurch ist sie mit der Massenspektrometrie kompatibel und ermöglicht das mehrfache Färben ein und desselben Gels (137). Auf diese Weise können in einem 2D-Projekt sowohl Phosphoproteine als auch das gesamte (Sub-) Proteom quantitativ erfasst werden. Andere Autoren haben die ProQ-DPS unter anderem mit DIGE (138), Sypro Ruby (139), ProQ Emerald Glykoprotein Stain oder einer Silberfärbung kombiniert (140). Eine Möglichkeit der eingeschränkten Sensitivität der ProQ-DPS zu begegnen ist eine Anreicherung von Phosphoproteinen vor der Auftrennung im 2D-Gel. Eine Immunpräzipitation, eine *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) oder TiO_2 -Anreicherung eignen sich jedoch nur für die Anreicherung von Phosphopeptiden, nicht zur Präfraktionierung einer komplexen Proteinprobe (123,124,141,142).

Die hochdynamische De-/Phosphorylierung von Phosphoproteinen, der geringe Phosphorylierungsgrad und die limitierte Methodik, posttranslationale Phosphorylierungen zu detektieren, erschweren eine quantitativ, vergleichende Phosphoproteomstudie. Mit der ProQ-DPS war es dennoch möglich >20 differentiell regulierte Phosphoproteinspots zu detektieren. Die Identifikation der differentiell regulierten Phosphoproteine ergab vor allem Effektorproteine wie den eEF2, die PKRL und die PAH. Proteine der Signaltransduktion konnten mit dieser Methodik nicht identifiziert werden. Auf der anderen Seite wurden Proteinspots detektiert, die von zu geringer Abundanz waren, um sie mittels MS zu identifizieren. Auch hier sind präparative Gele ein Lösungsansatz. Um spezifischere Fragestellungen (zum Beispiel die Lokalisation der *Phosphosite*, der Phosphorylierungsgrad, usw.) zu klären, sind eine Anreicherung von Phosphoproteinen/-Peptiden (z.B. durch Immunpräzipitation, IMAC oder TiO₂-Anreicherung (66,123,124)) in Kombination mit der Massenspektrometrie notwendig (121).

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Gemessen an der Anzahl der differentiell regulierten, zytosolischen Proteine hatte der zeitliche Verlauf der Operation den größten Einfluss die Phosphorylierung und Expression von Proteinen. Es zeigten sich Hinweise auf einen reduzierten Metabolismus der Leber durch die Hemmung der Proteinbiosynthese (eEF2), des Harnstoffzyklus (CPS1) und des gamma-Glutamylzyklus (5-Oxoprolinase).

Die vermehrte Expression von Serotransferrin lässt sich als IPC-induzierter, antioxidativer Mechanismus der Leber interpretieren. Da die Ischämie und Reperfusion ebenfalls zu einer vermehrten Expression von Serotransferrin führte, ist nicht sicher zu sagen, ob es sich hierbei um einen IPC-spezifischen Mechanismus handelt. Die IPC in Kombination mit IR hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation von Serotransferrin.

Ein direkter Einfluss der IPC auf posttranslationale Phosphorylierungen konnte mit der verwendeten Methodik nicht detektiert werden. Limitierend waren die Möglichkeiten gering abundante, regulatorische Proteine zu detektieren bzw. massenspektrometrisch zu identifizieren. Anhand der Phosphoproteine eEF2, PKRL und PAH waren Rückschlüsse auf die Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) möglich. Für die NAD-Kinase und Regucalcin waren bislang keine spezifischen Kinasen und auch keine Funktion einer Phosphorylierung beschrieben.

Eine Problematik der Proteinidentifikation mittels MS war eine zu geringe Proteinmenge der gering-abundanten Proteinspots. Für weiterführende Untersuchungsansätze besteht die Möglichkeit präparative Gele einzusetzen, wodurch die Abundanz gesteigert wird. Die Anreicherung von Phosphoproteinen bzw. Phosphopeptiden ermöglicht die Identifikation von *Phosphosites* und Phosphorylierungsgrad. Um die Bedeutung der posttranslationalen Phosphorylierungen auf funktioneller Ebene zu untersuchen, sind Studien mit entsprechenden Inhibitoren und Versuche an transgenen Tieren notwendig.

5 Literatur

1. Howard TK, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA, et al. The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation*. 1990;49(1):103.
2. Fellström B, Aküyrek LM, Backman U, Larsson E, Melin J, Zezina L. Postischemic reperfusion injury and allograft arteriosclerosis. In: *Transplantation proceedings* [Internet]. Elsevier; [cited 2012 Oct 19]. p. 4278–80. Available from: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=1643545>
3. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. 1998 Dec 21;5:402–8.
4. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. *Pathologie*. 4. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
5. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury a fresh look. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003 Apr;74(2):86–93.
6. Theodoraki K, Tympa A, Karmaniouli I, Tsaroucha A, Arkadopoulos N, Smyrniotis V. Ischemia/reperfusion injury in liver resection: a review of preconditioning methods. *Surg Today*. 2011 May;41(5):620–9.
7. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic Preconditioning Protects Against Ischaemia/Reperfusion Injury: Emerging Concepts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2005 Feb;29(2):106–15.
8. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2003;284(1):G15–26.
9. Klinker, Rainer, Pape, Hans-Christian, Silbernagl S. *Physiologie*. 5. ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2005.
10. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology*. 1989;10(3):292–9.
11. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: Effects of reperfusion. *Hepatology*. 1991;13(1):83–95.
12. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat

- liver. *J Leukoc Biol.* 1995 Mar 1;57(3):368–74.
13. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *European Journal of Biochemistry.* 1990;192(2):245–61.
 14. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chemico-Biological Interactions.* 1991;79(2):115–36.
 15. Epstein FH, McCord JM. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. *New England Journal of Medicine.* 1985 Jan 17;312(3):159–63.
 16. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine.* 1991 Sep 30;91(3, Supplement 3):S14–22.
 17. 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.* 1993 Feb;91(2):456–64.
 18. Bernardi P. Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers, and Permeability Transition. *Physiol Rev.* 1999 Jan 10;79(4):1127–55.
 19. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of “reflow paradox.” *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1992Dec1;263(6):H1901-6.
 20. Menger M, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary “no-reflow”. *Shock.* 1997 Jul;8(1):2–7.
 21. Clemens M, Bauer M, Pannen B, Bauer I, Zhang J. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock.* 1997 Aug;8(2):80–5.
 22. Dayton C. Ischemic Preconditioning Prevents Postischemic Arteriolar, Capillary, and Postcapillary Venular Dysfunction: Signaling Pathways Mediating the Adaptive Metamorphosis to a Protected Phenotype in Preconditioned Endothelium, *Microcirculation*, Informa Healthcare [Internet]. [cited 2013 Jul 3]. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/mic.9.2.73.89>
 23. Rezkalla SH, Kloner RA. No-Reflow Phenomenon. *Circulation.* 2002 Feb 5;105(5):656–62.
 24. Murry C, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986 Nov 1;74(5):1124–36.
 25. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology.*

- 2003 Nov;125(5):1480–91.
26. Bolli R. The Late Phase of Preconditioning. *Circulation Research*. 2000 Nov 24;87(11):972–83.
 27. Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. 1986 Jan 17;231(4735):234–41.
 28. Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z, Lessov NS, Harrington CA, Mori M, et al. Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *The Lancet*. 2003 Sep 27;362(9389):1028–37.
 29. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circulation Research*. 1990 Apr 1;66(4):913–31.
 30. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. Ischemic preconditioning reduces Na⁺ accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology*. 2000;31(1):166–72.
 31. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res*. 1995 Jun 1;29(6):782–8.
 32. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpí E, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jul 1;279(1):G163–71.
 33. Vincent MF, Bontemps F, Van den Berghe G. Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. *Biochem J*. 1992 Jan 1;281(Pt 1):267–72.
 34. Hardie DG, Salt IP, Hawley SA, Davies SP. AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J*. 1999 Mar 15;338(Pt 3):717–22.
 35. Peralta C, Bartrons R, Serafín A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology*. 2001;34(6):1164–73.
 36. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A2 receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers. *Hepatology*. 2000;32(2):297–302.

37. Pilakis SJ, Granner DK. Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annual Review of Physiology*. 1992;54(1):885–909.
38. M.B. Jiménez-Castro, M. Elias-Miró, A. Casillas-Ramírez, C. Peralta. Experimental Models in Liver Surgery. In 2013.
39. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol*. 1985;5:183–9.
40. Fernández L, Heredia N, Grande L, Gómez G, Rimola A, Marco A, et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: Role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology*. 2002;36(3):562–72.
41. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1991 Mar 1;260(3):G355–62.
42. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *Journal of Hepatology*. 2003 Jan;38(1):59–66.
43. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1999 Dec 1;277(6):H2476–81.
44. Shinoda M, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, Kitajima M. Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning†. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2002;17(11):1211–9.
45. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op den Winkel M, Fraunberger P, Bilzer M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: A novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology*. 2003;37(2):286–95.
46. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2001 Jan 1;33(1):131–9.
47. Kim G-T, Chun Y-S, Park J-W, Kim M-S. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003 Sep 26;309(3):619–24.

48. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1995 May 1;268(5):H2063–7.
49. Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N, et al. Ischemic Preconditioning Prevents Endothelial Injury and Systemic Neutrophil Activation During Ischemia-Reperfusion in Humans In Vivo. *Circulation.* 2001 Mar 27;103(12):1624–30.
50. Peralta C, Closa D, Hotter G, Prats N, Roselló-Catafau J. Liver Ischemic Preconditioning Is Mediated by the Inhibitory Action of Nitric Oxide on Endothelin. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1996 Dezember;229(1):264–70.
51. 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.* 1992;16(2):454–61.
52. 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. *Hepato-gastroenterology.* 49(46):1069–73.
53. 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. *British Journal of Surgery.* 2003;90(1):17–22.
54. Yamashita Y SM. Effects of preoperative steroid administration on surgical stress in hepatic resection: Prospective randomized trial. *Arch Surg.* 2001 März;136(3):328–33.
55. Kawano T, Hosokawa N, Maruta T, Maruta N, Takasaki M. [Reevaluation of protective effects of alprostadil on hepatic function in patients undergoing hepatectomy]. *Masui.* 2005 Sep;54(9):982–91.
56. Orii R, Sugawara Y, Hayashida M, Yamada Y, Chang K, Takayama T, et al. Effects of aminone on ischaemia–reperfusion injury in cirrhotic patients undergoing hepatectomy: a comparative study with prostaglandin E1. *Br J Anaesth.* 2000 Sep 1;85(3):389–95.
57. Bartels M, Biesalski HK, 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. *Clinical Nutrition.* 2004 Dec;23(6):1360–70.
58. Smyrniotis V, Theodoraki K, Arkadopoulos N, Fragulidis G, Condi-Pafiti A, Plemenou-Fragou M, et al.

- Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study. *The American Journal of Surgery*. 2006 Nov;192(5):669–74.
59. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebah M, Ichai P, et al. Ischemic Preconditioning for Major Liver Resection under Vascular Exclusion of the Liver Preserving the Caval Flow: A Randomized Prospective Study. *Journal of the American College of Surgeons*. 2006 Feb;202(2):203–11.
60. Vascotto C, Cesaratto L, D'Ambrosio C, Scaloni A, Avellini C, Paron I, et al. Proteomic analysis of liver tissues subjected to early ischemia/reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *PROTEOMICS*. 2006;6(11):3455–65.
61. Hirsch J, Hansen KC, Choi S, Noh J, Hirose R, Roberts JP, et al. Warm Ischemia-induced Alterations in Oxidative and Inflammatory Proteins in Hepatic Kupffer Cells in Rats. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jun 1;5(6):979–86.
62. Tiriveedhi V, Conzen KD, Liaw-Conlin J, Upadhy G, Malone J, Townsend RR, et al. The role of molecular chaperonins in warm ischemia and reperfusion injury in the steatotic liver: A proteomic study. *BMC Biochemistry*. 2012 Sep 10;13(1):17.
63. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006 Sep;7(9):880–5.
64. Xu C, Zhang X, Yu C, Lu G, Chen S, Xu L, et al. Proteomic analysis of hepatic ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning in mice revealed the protective role of ATP5 β . *PROTEOMICS*. 2009;9(2):409–19.
65. Wilson CH, Zeile S, Chataway T, Nieuwenhuijs VB, Padbury RTA, Barritt GJ. Increased expression of peroxiredoxin 1 and identification of a novel lipid-metabolizing enzyme in the early phase of liver ischemia reperfusion injury. *PROTEOMICS*. 2011;11(22):4385–96.
66. Zhao Y, Jensen ON. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *PROTEOMICS*. 2009;9(20):4632–41.
67. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Biochemie: 50 Tabellen*. Stuttgart: Thieme; 2006.
68. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995;80(2):225–36.

69. Emadali A, Metrakos PP, Kalantari F, Boutros T, Boismenu D, Chevet E. Proteomic analysis of tyrosine phosphorylation during human liver transplantation. *Proteome Science*. 2007 Jan 2;5(1):1.
70. Braun S, Plitzko G, Bicknell L, van Caster P, Schulz J, Barthuber C, et al. Pretreatment With Helium Does Not Attenuate Liver Injury After Warm Ischemia-Reperfusion: *Shock*. 2014 May;41(5):413–9.
71. Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, Loop T, Humar M, Halverscheid L, et al. Heme Oxygenase-1 Induction by the Clinically Used Anesthetic Isoflurane Protects Rat Livers From Ischemia/Reperfusion Injury. *Ann Surg*. 2007 Jun;245(6):931–42.
72. Kubulus D, Rensing H, Paxian M, Thierbach J-T, Meisel T, Redl H, et al. Influence of heme-based solutions on stress protein expression and organ failure after hemorrhagic shock*. *Critical care medicine*. 2005;33(3):629–37.
73. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, others. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem*. 1951;193(1):265–75.
74. 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. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY*. 2002;23(11):1511–2.
75. Dyballa N, Metzger S. Fast and Sensitive Coomassie Staining in Quantitative Proteomics. In: Marcus K, editor. *Quantitative Methods in Proteomics* [Internet]. Humana Press; 2012 [cited 2013 Oct 23]. p. 47–59. (Methods in Molecular Biology). Available from: http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-885-6_4
76. Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H, Ito H, Yamamoto S, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. In: *Transplantation proceedings*. 2000. p. 2310–3.
77. Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, et al. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hep Bil Pancr Surg*. 2001 Oct 1;8(5):461–8.
78. Saito T, Ishii S, Abe T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, et al. Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription. In: *Transplantation proceedings*. 2001. p. 849.
79. Rudiger HA, Kang K-J, Sindram D, Riehle H-M, Clavien P-A. Comparison of Ischemic

- Preconditioning and Intermittent and Continuous Inflow Occlusion in the Murine Liver. *Ann Surg.* 2002 Mar;235(3):400–7.
80. Koti RS, Yang W, Glantzounis G, Quaglia A, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischaemic preconditioning on hepatic oxygenation, microcirculation and function in a rat model of moderate hepatic steatosis. *Clinical Science.* 2005;108(1):55–64.
81. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000 Feb;49(2, Supplement 1):3–8.
82. Mazurek B, Rheinländer C, Fuchs F-U, Amarjargal N, Kuban R-J, Ungethüm U, et al. Einfluss von Ischämie/Hypoxie auf die HIF-1-Aktivität und Expression von hypoxieabhängigen Genen in der Kochele der neugeborenen Ratte. *HNO.* 2006 Sep;54(9):689–97.
83. Brands R, Hoogenraad N. Immunology and Cell Biology - Abstract of article: Import of carbamoylphosphate synthase and ornithine transcarbamylase into mitochondria of rat: Detection of aggregates of enzyme in cytoplasm and mitochondria using immunoelectron microscopy with the protein A-gold method. *Aust J Exp Biol Med.* 1986 Apr;64(2):165–73.
84. Werf PVD, Orłowski M, Meister A. Enzymatic Conversion of 5-Oxo-L-Proline (L-Pyrrolidone Carboxylate) to L-Glutamate Coupled with Cleavage of Adenosine Triphosphate to Adenosine Diphosphate, a Reaction in the γ -Glutamyl Cycle. *PNAS.* 1971 Dec 1;68(12):2982–5.
85. Pastore A, Piemonte F. S-Glutathionylation signaling in cell biology: Progress and prospects. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012 Aug 15;46(5):279–92.
86. Itoh H, Kobayashi R, Wakui H, Komatsuda A, Ohtani H, Miura AB, et al. Mammalian 60-kDa Stress Protein (Chaperonin Homolog). Identification, biochemical properties and localization. *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):13429–35.
87. Soltys BJ, Gupta RS. Immunoelectron Microscopic Localization of the 60-kDa Heat Shock Chaperonin Protein (Hsp60) in Mammalian Cells. *Experimental Cell Research.* 1996 Jan 10;222(1):16–27.
88. Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J, et al. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology.* 2000;31(2):407–15.
89. Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestrlil R, Scheffler IE, Dillmann WH. Combined and Individual Mitochondrial HSP60 and HSP10 Expression in Cardiac Myocytes Protects Mitochondrial Function and Prevents Apoptotic Cell Deaths Induced by Simulated Ischemia-Reoxygenation. *Circulation.* 2001 Apr

- 3;103(13):1787–92.
90. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*. 1993 Sep 1;88(3):1264–72.
 91. Ryazanov AG, Shestakova EA, Natapov PG. Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature*. 1988 Jul 14;334(6178):170–3.
 92. Nairn AC, Palfrey HC. Identification of the major Mr 100000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem*. 1987 Dec 25;262(36):17299–303.
 93. Althausen S, Mengesdorf T, Mies G, Oláh L, Nairn AC, Proud CG, et al. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 α , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Journal of Neurochemistry*. 2001;78(4):779–87.
 94. Burda J, Hrehorovská M, Bonilla LG, Danielisová V, Čížková D, Burda R, et al. Role of Protein Synthesis in the Ischemic Tolerance Acquisition Induced by Transient Forebrain Ischemia in the Rat. *Neurochem Res*. 2003 Aug 1;28(8):1213–9.
 95. García L, O’Loughlen A, Martín M e., Burda J, Salinas M. Does phosphorylation of eukaryotic elongation factor eEF2 regulate protein synthesis in ischemic preconditioning? *Journal of Neuroscience Research*. 2004;77(2):292–8.
 96. Moser K, White FM. Phosphoproteomic Analysis of Rat Liver by High Capacity IMAC and LC–MS/MS. *J Proteome Res*. 2006 Jan 1;5(1):98–104.
 97. Knebel A, Haydon C, Morrice N, Cohen P. Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and-insensitive pathways. *Biochem J*. 2002;367:525–32.
 98. Horman S, Browne GJ, Krause U, Patel JV, Vertommen D, Bertrand L, et al. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Leads to the Phosphorylation of Elongation Factor 2 and an Inhibition of Protein Synthesis. *Current Biology*. 2002 Aug 20;12(16):1419–23.
 99. Georg Löffler, Petrides P, Heinrich P, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer; 2007.
 100. Kronen A, Jungermann K, Kietzmann T. Cross-Talk between the Signals Hypoxia and Glucose at the

- Glucose Response Element of the L-Type Pyruvate Kinase Gene. *Endocrinology*. 2001 Jun 1;142(6):2707–18.
101. Lundby A, Secher A, Lage K, Nordsborg NB, Dmytriiev A, Lundby C, et al. Quantitative maps of protein phosphorylation sites across 14 different rat organs and tissues. *Nat Commun*. 2012 Jun 6;3:876.
102. Hoffert JD, Pisitkun T, Wang G, Shen R-F, Knepper MA. Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: Regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites. *PNAS*. 2006 May 2;103(18):7159–64.
103. Kimura S, Zhang G-X, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan Y-Y, et al. Role of NAD(P)H Oxidase- and Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Cardioprotection of Ischemic Reperfusion Injury by Angiotensin II. *Hypertension*. 2005 May 1;45(5):860–6.
104. Zhang R. MNADK, a novel liver-enriched mitochondrion-localized NAD kinase. *Biology Open*. 2013 Apr 15;2(4):432–8.
105. Yamaguchi M. Role of regucalcin in calcium signaling. *Life Sciences*. 2000 März;66(19):1769–80.
106. Demirkan G, Yu K, Boylan JM, Salomon AR, Gruppuso PA. Phosphoproteomic Profiling of In Vivo Signaling in Liver by the Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1). *PLoS ONE*. 2011 Jun 28;6(6):e21729.
107. Zgoda V, Tikhonova O, Viglinskaya A, Serebriakova M, Lisitsa A, Archakov A. Proteomic profiles of induced hepatotoxicity at the subcellular level. *PROTEOMICS*. 2006;6(16):4662–70.
108. Wu Q, Zhang Y-H, Zhao X, Shi W-L, Pu X-P. Proteome studies on liver tissue in a phenobarbital-induced rat model. *European Journal of Pharmacology*. 2011 Nov 30;670(2–3):333–40.
109. Wilson-Grady JT, Haas W, Gygi SP. Quantitative comparison of the fasted and re-fed mouse liver phosphoproteomes using lower pH reductive dimethylation. *Methods*. 2013 Jun 15;61(3):277–86.
110. Wretborn M, Humble E, Ragnarsson U, Engström L. Amino acid sequence at the phosphorylated site of rat liver phenylalanine hydroxylase and phosphorylation of a corresponding synthetic peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1980 März;93(2):403–8.
111. Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, et al. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Mol Biol*. 1999 Mai;6(5):442–8.

112. Hoving S, Voshol H, van Oostrum J. Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels. *ELECTROPHORESIS*. 2000;21(13):2617–21.
113. Lilley KS, Razzaq A, Dupree P. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002 Feb 1;6(1):46–50.
114. Lescuyer P, Hochstrasser DF, Sanchez J-C. Comprehensive proteome analysis by chromatographic protein prefractionation. *ELECTROPHORESIS*. 2004;25(7-8):1125–35.
115. Pasquali C, Fialka I, Huber LA. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999 Feb 5;722(1–2):89–102.
116. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *PNAS*. 2000 Aug 15;97(17):9390–5.
117. Delom F, Chevet E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Science*. 2006 Jul 19;4(1):15.
118. Schulenberg B, Goodman TN, Aggeler R, Capaldi RA, Patton WF. Characterization of dynamic and steady-state protein phosphorylation using a fluorescent phosphoprotein gel stain and mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS*. 2004 Aug 1;25(15):2526–32.
119. Paradela A, Albar JP. Advances in the Analysis of Protein Phosphorylation. *J Proteome Res*. 2008 Mai;7(5):1809–18.
120. Sickmann A, Meyer HE. Phosphoamino acid analysis. *PROTEOMICS*. 2001;1(2):200–6.
121. Reinders J, Sickmann A. State-of-the-art in phosphoproteomics. *PROTEOMICS*. 2005;5(16):4052–61.
122. Wu R, Haas W, Dephoure N, Huttlin EL, Zhai B, Sowa ME, et al. A large-scale method to measure absolute protein phosphorylation stoichiometries. *Nat Methods*. 2011 Jul 3;8(8):677–83.
123. Raggiaschi R, Gotta S, Terstappen G. Phosphoproteome analysis. *Bioscience reports*. 2005;25:33–44.
124. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJD. Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Jul 1;4(7):873–86.
125. Wu S, Wan P, Li J, Li D, Zhu Y, He F. Multi-modality of pI distribution in whole proteome.

PROTEOMICS. 2006;6(2):449–55.

6 Anhang

6.1 Optimierung der Proteinisolierung

Das Protokoll zur Homogenisation und differentiellen Zentrifugation wurde bereits in früheren Proteomstudien verwandt und für die Fraktionierung der Rattenleber angepasst und optimiert. So wurden, um eine quantitative Analyse des Phosphoproteoms zu ermöglichen, neben Proteaseinhibitoren auch Phosphataseinhibitoren (NaF, Na₃VO₄, EGTA) verwendet. Durch Zentrifugationsschritte wurden Zellbestandteile mit großem Sedimentationskoeffizienten pelletiert, sodass gelöste Proteine, welche im Wesentlichen der zytosolischen Fraktion entsprechen, mit dem verbliebenen Überstand abpipettiert werden konnten. Um keinen systematischen Fehler zu begehen, wurden alle Proben absolut identisch behandelt. Anhand von Western blots konnte die Reinheit der zytosolischen Fraktion überprüft werden. Insgesamt wurden vier Western blots, jeweils gegen ein spezifisches Protein jeder Fraktion, durchgeführt. Drei der vier Western blots wurden von Dipl.-Biol. T. Strahl durchgeführt. Für die nukleäre Fraktion wurde ein Anti-Lamin B-Antikörper, für die mitochondriale Fraktion ein Anti-Prohibitin-Antikörper, für die zytosolische Fraktion ein Anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Antikörper (Anti-GAPDH) und für die Membranfraktion ein Anti-Na/K-ATPase-Antikörper gewählt. Die Ergebnisse der Blots sind in Abb. 18 dargestellt.

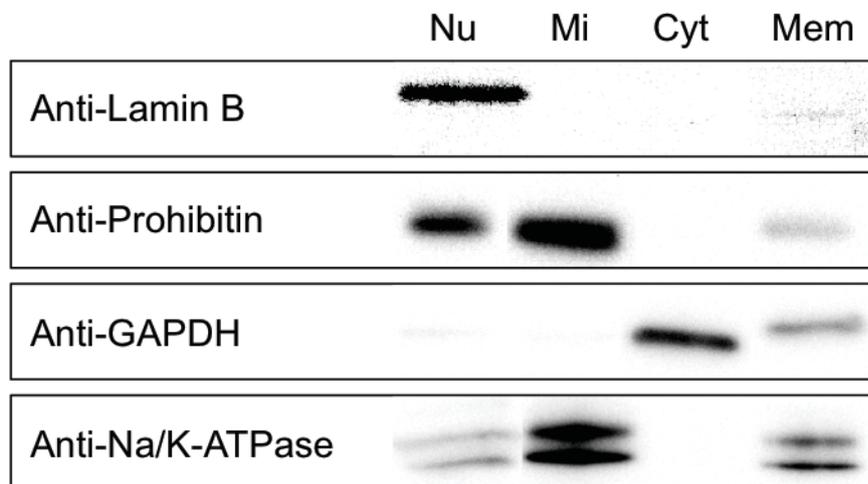


Abb. 18 **Western blots gegen fraktionenspezifische Proteine.** Lamin B ist spezifisch für den Zellkern, Prohibitin für Mitochondrien, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) für das Zytosol und die Na/K-ATPase für die Membranfraktion. (Nu: Nukleäre Fraktion, Mi: Mitochondriale Fraktion, Cyt: Zytosolische Fraktion, Mem: Membranfraktion).

Die zytosolische GAPDH hat am stärksten in der zytosolischen Fraktion und nur gering in der Membranfraktion reagiert (Abb. 18). In der nukleären und mitochondrialen Fraktion hat der Anti-GAPDH-AK keine Reaktion gezeigt. Kein Antikörper der anderen Fraktionen hat mit der zytosolischen Fraktion reagiert. Für die zytosolische Fraktion konnte somit ein relativ guter Reinheitsgrad nachgewiesen werden. Die Western blots der nukleären, der mitochondrialen und der Membranfraktion waren im Vergleich zur zytosolischen Fraktion nicht eindeutig. Hier reagierten Antikörper nicht nur in der für sie spezifischen, sondern auch mit anderen Fraktionen (Anti-Prohibitin, Anti-Na/K-ATPase).

6.2 Optimierung der 2D-Gelelektrophorese

6.2.1 Optimierung der ersten Dimension

In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Dies geschieht auf einem dünnen Gelstreifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen). Die verwendeten 7 cm - Immobiline™ DryStrips von GE Healthcare Bio-Science zeigen eine gute, reproduzierbare Auflösung über einen großen pH-Bereich (pH 3-10) (Abb. 19) und decken die pI-Werte der allermeisten zytosolischen Proteine ab (125). Die Proteinmenge hat entscheidenden Einfluss auf die Abgrenzbarkeit und Schärfe von Proteinspots. Wird zu viel Protein aufgetragen, so kommt es zu Überlagerungen von Proteinspots und sowohl Spotschärfe, als auch Spotabgrenzbarkeit nehmen ab. Wird zu wenig Protein aufgetragen, reicht eventuell die Sensitivität der Färbung nicht aus, Proteine sehr geringer Abundanz zu erfassen.

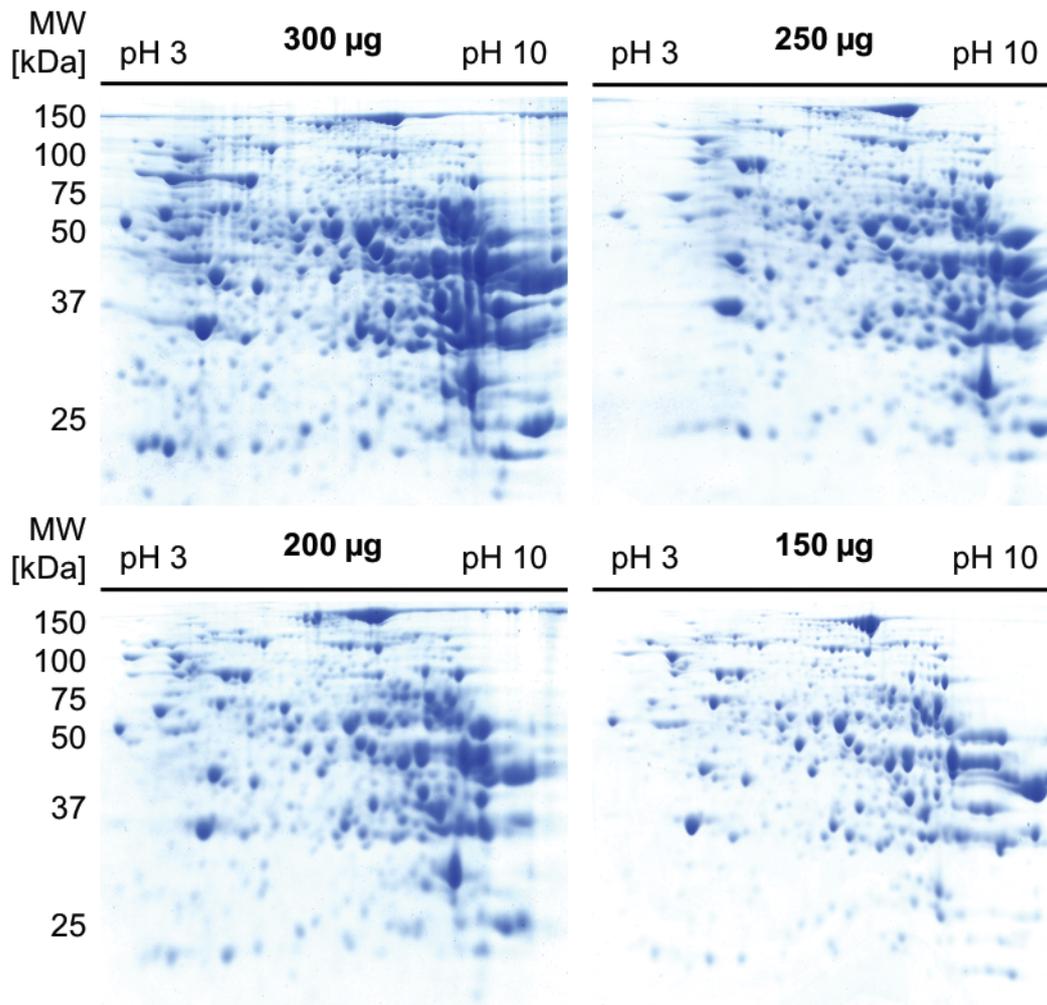


Abb. 19 **Einfluss der Proteinmenge auf das Auflösungsvermögen der ersten Dimension.**
Coomassie-gefärbte 2D-Gelbilder mit 300 µg, 250 µg, 200 µg und 150 µg Protein. Bei 150 µg Protein besteht die beste Abgrenzbarkeit und Schärfe der Proteinspots.

Es wurden unterschiedlichen Proteinmengen getestet, um die ideale Proteinmenge für den 7 cm-IPG Streifen zu ermittelt. Auf Abb. 19 sind die 2D-Gelbilder für 300 µg, 250 µg, 200 µg und 150 µg Protein dargestellt. Besonders anschaulich ist der Vergleich von 300 µg gegenüber 150 µg. Im basischen und im sauren pH-Bereich ist die Spotabgrenzung auf dem 300 µg-Gelbild wesentlich schlechter als auf dem 150 µg-Gelbild. Die beste Abgrenzbarkeit und Schärfe der Proteinspots wurde mit einer Proteinmenge von 150 µg erreicht.

6.2.2 Optimierung der zweiten Dimension

In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Entscheidende Variablen für die Qualität der vertikalen Spotauftrennung sind die Laufstrecke, die Spannung während des Gellaufes und der PAA-Anteil des Gels. Die Laufstrecke ist durch die Größe der PAA-Gele (Laufstrecke \approx 65 mm)

limitiert. Die Gelelektrophorese wird gestoppt, sobald die Lauffront (dünner Bromphenolblau-Streifen) das PAA-Gel verlassen hat. In Abb. 20 ist exemplarisch dargestellt, dass bei längerer Laufzeit die Spotauftrennung insbesondere im großen Molekulargewichtsbereich zunimmt, jedoch Proteine < 20 kDa das Gel verlassen (rot markierter Gelbereich). Mit längerer Elektrophorese-Zeit nimmt außerdem die Diffusion insbesondere kleiner Proteine zu. Dies reduziert die Spot-Schärfe. Abb. 20 zeigt nach 70 min das Ergebnis der optimierten zweiten Dimension, ohne Verlust der kleinen Proteine und mit maximaler Spot-Schärfe.

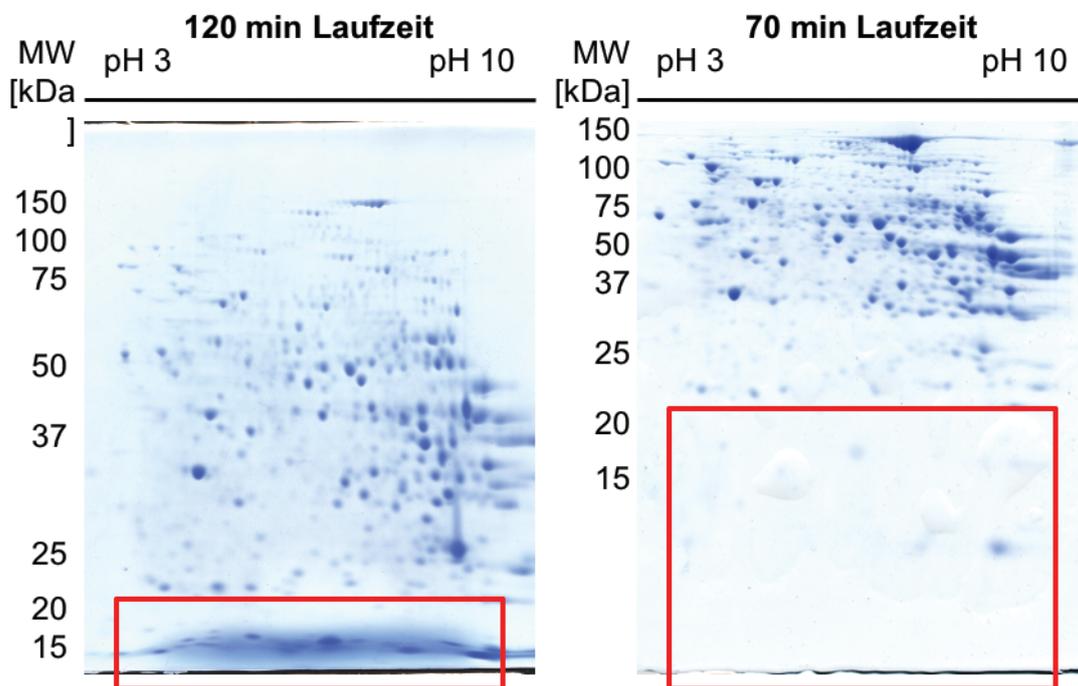


Abb. 20 **Einfluss der Laufstrecke auf die Auflösung der zweiten Dimension.** Rot markiert ist der Molekulargewichtsbereich, der sich bei dem linken Gelbild einer Auswertung entzieht.

Durch eine höhere Spannung lässt sich die Laufzeit der Gelelektrophorese weiter verkürzen. Dies führt jedoch zu einer stärkeren Erwärmung des PAA-Gels und lässt dieses erweichen. Durch eine Kühlung der Gelkammern mit Eis, konnte die Spannung um 30 V auf 150 V erhöht werden und die Laufzeit von ca. 90 min auf 70 min reduziert werden. Der PAA-Anteil hat Einfluss auf die Laufzeit und die Festigkeit des Gels. Getestet wurden 10%ige, 11%ige und 12%ige PAA-Gele. Verwendet wurden 11%ige PAA-Gele, welche ein Kompromiss aus Festigkeit und relativ kurzer Laufzeit sind (Gelbilder nicht dargestellt). Die Spotauftrennung der zweiten Dimension ist im Wesentlichen durch die Größe des PAA-Gels begrenzt. Der entscheidende Vorteil eines kleinen PAA-Gels liegt in der kurzen Laufzeit, den geringen Materialkosten, der leichten, technischen Handhabung und einer guten Spotauftrennung.

Optimale Ergebnisse lieferten 11%ige PAA-Gele (Laufstrecke 65 mm), eine Spannung von 150V (70-minütiger Gellauf), sowie gekühlte Laufkammern (Abb. 7).

Danksagung

Mein Dank gilt:

Meiner Doktormutter, Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Meiner Betreuerin, Dr. rer. nat. Sabine Metzger

Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Braun

Meinen Kollegen und Freunden, Dr. med. Carina Büren, Dr. rer. nat. Nadine Dyballa,
Simon Weidhaas, Thorsten Strahl

Dr. med. Julia Ferber

und meiner Familie.