

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Veränderungen des pulmonalen Proteoms
in der experimentellen Herzinsuffizienz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sarah Hierl

2015

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Veränderungen des pulmonalen Proteoms
in der experimentellen Herzinsuffizienz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sarah Hierl

2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Luchner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schweda
Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2015

Meinen Eltern,
die an mich geglaubt haben

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	- 8 -
2. Ziel der Dissertation	- 11 -
3. Methoden.....	- 12 -
3.1 Tiermodell	- 12 -
3.1.1 Induktion der experimentellen Herzinsuffizienz	- 12 -
3.1.2 Evaluation durch Echokardiographie und hämodynamische Messungen	- 12 -
3.2 Probenbereitung.....	- 14 -
3.2.1 Probenentnahme	- 14 -
3.2.2 Proteinquantifizierung	- 14 -
3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese	- 15 -
3.3.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)	- 15 -
3.3.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE	- 17 -
3.4 Proteindetektion mit kolloidaler Coomassie-Färbung.....	- 20 -
3.5 Computerassistierte Auswertung	- 21 -
3.6 Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie.....	- 23 -
3.6.1 Proteinverdau.....	- 23 -
3.6.2 Massenspektrometrie und Datenbankabgleich	- 24 -
3.7 Validierung mit Western Blot.....	- 25 -
3.8 Vorarbeiten	- 28 -
3.9 Eigenanteil	- 29 -
4. Material.....	- 30 -
4.1 Chemikalien.....	- 30 -
4.2 Kits.....	- 32 -

4.3 Lösungen	- 33 -
4.4 Polyacrylamidgele	- 34 -
4.5 Verbrauchsmaterial.....	- 35 -
4.6 Antikörper.....	- 36 -
4.7 Geräte und Software	- 37 -
5. Ergebnisse.....	- 39 -
5.1 Kardiale Anpassungsvorgänge in der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz -	39 -
5.2 Analyse des pulmonalen Proteoms im zweidimensionalen Bild	- 41 -
5.3 Signifikant veränderte Proteinexpressionen	- 43 -
5.4 Validierung mit Western Blot.....	- 45 -
6. Diskussion	- 47 -
6.1 Tachykardie-induzierte Herzinsuffizienz im Tiermodell	- 47 -
6.2 Pulmonale molekulare Veränderungen in der experimentellen manifesten Herzinsuffizienz.....	- 48 -
6.2.1 Modifikation der Zusammensetzung des Zytoskeletts	- 48 -
6.2.2 Veränderung der alveolokapillären Permeabilität	- 48 -
6.2.3 Reduktion der enzymalen antioxidativen Fähigkeit	- 49 -
6.2.4 Beeinflussung der zellulären Energiegewinnung	- 50 -
6.2.5 Verstärkte Expression von Indolethylamine N-Methyltransferase	- 51 -
7. Zusammenfassung und Ausblick.....	- 52 -
8. Literaturverzeichnis	- 53 -
9. Anhang.....	- 58 -
9.1 Abkürzungsverzeichnis	- 58 -
9.2 Danksagung	- 59 -
9.3 Erklärung zum Promotionsverfahren gemäß Promotionsordnung	- 60 -

1. Einleitung

Herzinsuffizienz ist eine pathologische Veränderung der kardialen Struktur oder Funktion, woraus die Unfähigkeit des Herzens resultiert, das vom Organismus zur Sauerstoffversorgung der Gewebe benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu transportieren. Klinisch imponiert das Erscheinungsbild als Syndrom – das Vorliegen unterschiedlicher typischer Symptome und klinischer Zeichen als Folge der Ventrikelfunktionsstörung. Induziert durch die eingeschränkte systolische Ventrikelfunktion resultiert eine komplexe systemische Antwort, die neben dem Herzen selbst auch diverse andere Organe wie das Gefäßsystem, Nieren, Muskeln, Knochenmark, Leber sowie auch die Lunge betrifft. Ebenso vielfältig stellt sich die Ätiologie dar. Die koronare Herzkrankheit ist für zwei Drittel der Krankheitsfälle kausal, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus tragen häufig zusätzlich bei. Weitere Ursachen für Myokarderkrankungen, die zur Herzinsuffizienzentwicklung führen können, sind die Hypertonie alleine und die Kardiomyopathie, die genetisch bedingt sein kann, wie die dilative Kardiomyopathie, oder erworben, so etwa infektiös (z.B. Viren) oder toxisch (z.B. Alkoholabusus, Chemotherapie). Bei der Ursachensuche müssen auch weitere ätiologische Gruppen in Erwägung gezogen werden wie Klappenvitien, Perikard- und Endokarderkrankungen, kongenitale Herzfehler sowie Herzrhythmus- und Reizleitungsstörungen – um nur einige zu nennen [1].

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz wird mit 1-2% der erwachsenen Bevölkerung in den westlichen Ländern mit Anstieg bis 10% und mehr bei 75-Jährigen und Älteren aufgrund diverser epidemiologischer Studien geschätzt. Die jährliche Inzidenz beträgt 5-10 pro 1000 mit ebensolchem mit dem Alter korrespondierenden Anstieg [2]. Zudem zeigen derartige Studien, dass die Herzinsuffizienz hohe Kostenaufwände verursacht sowie häufige Hospitalisierung und hohe Mortalitätsraten. Im Ausblick auf die nächsten Jahrzehnte muss eher eine Verschärfung der Situation eingestanden werden aufgrund des Anstiegs der Zahl der älteren Menschen in der Bevölkerung wegen höherer Lebenserwartung sowie aufgrund höherer Überlebensraten nach Myokardinfarkt wegen eines verbesserten Notfall- und Krankheitsmanagements bei ischämischer Herzerkrankung, das die verbesserte Zugangsmöglichkeit zur Revaskularisationstherapie inkludiert [3].

Gerade die Lunge erscheint in diesem komplexen Krankheitsbild von besonderem Interesse. Sie ist das funktionell interponierte Organ zwischen rechtem und linkem Herzen. Anatomisch teilen sich die beiden Lungenflügel mit dem Herzen den Thoraxraum, in dem

kardiovaskuläres und respiratorisches System mit unterschiedlichen Drucksystemen arbeiten. Dies führt zur gegenseitigen hämodynamischen Beeinflussung, was als kardiopulmonale Interaktionen bezeichnet wird [4]. Auch viele der subjektiven Symptome sowie klinischen Zeichen im Erscheinungsbild des Syndroms zeigen eine Beteiligung der Atmung offensichtlich an: Atemnot, Orthopnoe, paroxysmale nächtliche Dyspnoe, nächtlicher Husten, keuchende Atmung sowie Zyanose, Tachypnoe, verminderte Sauerstoffsättigung in der Pulsoxymetrie, Rasselgeräusche bei der Auskultation und dumpfer Klopfsschall bei der Perkussion der basalen Lungenabschnitte [1].

Die Erforschung der Herzinsuffizienz konzentriert sich zumeist auf das primär betroffene Organ, das Herz. Die Lunge betreffend zeigten Untersuchungen, dass Druck- und Volumenüberlastung, wie sie in der Herzinsuffizienz auftreten, zur Beeinflussung der histologisch-anatomischen Beschaffenheit der alveolokapillären Membran führen. Dies ist durch Brüche der Endothel- und Alveolarzellen gekennzeichnet [5-7] und beeinträchtigt den Gas- und Flüssigkeitsaustausch besonders in den distalen Atemwegsbereichen. Es resultiert der Verlust der Regulationsfähigkeit über den Flüssigkeitsaustausch [8] und damit die Ausbildung eines Lungenödems durch pathologische Permeabilitätserhöhung der alveolokapillären Membran [6]. Das funktionelle Korrelat zur Störung des Gasaustauschs über der besagten Membran ist ein erhöhter Widerstand. Diese Veränderungen sind prinzipiell reversibel, sobald die Wirkung der Stressfaktoren nachlässt. Falls dies allerdings ausbleibt und eine chronische Druck- und Volumenbelastung der pulmonalen Mikrozirkulation besteht, kommt es zu einem fortschreitenden Umbauvorgang von pathophysiologischer und klinischer Bedeutung, der durch Proliferation von Kollagenfasern in der extrazellulären Matrix und erneute Expression fetaler Gene charakterisiert ist. Die resultierende Funktionsstörung der alveolokapillären Membran trägt durch Reduktion der Diffusionskapazität nach heutigen Erkenntnissen zur Symptomexazerbation und Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit bei und ist ein Prognosefaktor des klinischen Verlaufs. Sie zeigt sich refraktär hinsichtlich therapeutischer Maßnahmen wie Volumenverminderung durch Ultrafiltration und sogar Herztransplantation. Einige Medikamente modulieren den Umbauprozess des Lungengerüsts, erhöhen die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid und verbessern den Gasaustausch. Hierzu gehören Enalapril, ein ACE-Hemmer, sowie Sildenafil, ein Phosphodiesterase-5-Hemmer. Auch Spironolacton, ein Aldosteronantagonist, und Bisoprolol, ein β -Blocker, verbessern die Diffusionskapazität der Lunge [8, 9].

Die beschriebenen pulmonalen Adaptationsvorgänge scheinen anfangs protektiven Charakter zu besitzen, indem sie einer weiteren Lungenödementwicklung entgegenwirken, sind dann aber ein wesentlicher Bestandteil der Probleme im späteren Verlauf der Herzinsuffizienz [10].

Da das Wissen über zugrunde liegende molekulare Mechanismen rar ist, ist die Charakterisierung früher pulmonaler Adaptationen in der manifesten Herzinsuffizienz somit auf strukturelle und ultrastrukturelle Untersuchungen beschränkt. Um einen Einstieg in neue therapeutische Ansatzpunkte zu ermöglichen, bilden die Entdeckung und das Verständnis molekularer pulmonaler Adaptationsvorgänge die Grundlage. Das Ziel dieser Arbeit ist die Bildung dieser Grundlage durch Aufdeckung der Veränderungen des pulmonalen Proteoms in der manifesten Herzinsuffizienz. Dies erfolgt durch eine objektive reproduzierbare pulmonale Proteomstudie anhand eines Tiermodells der tachykardieinduzierten Herzinsuffizienz in Kaninchen, wobei sich dieses Studienkonzept bereits zuvor zum Verständnis wichtiger pathophysiologischer molekularer Veränderungen in der Herzinsuffizienz als effektiv erwiesen hat [11].

2. Ziel der Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit sind die Detektion von Veränderungen des pulmonalen Proteinexpressionsmusters in der manifesten Herzinsuffizienz und die Identifizierung der quantitativ modifizierten Proteine mit einer objektiven proteomischen Screeningmethode. Hiermit sollen bisher uncharakterisierte molekulare Veränderungen aufgedeckt werden.

Detektion von quantitativen Veränderungen des pulmonalen Proteinexpressionsmusters

Die Zielformulierung der Dissertation beinhaltet die Frage, ob in der experimentellen Herzinsuffizienz quantitative Veränderungen des pulmonalen Proteoms auftreten. Die Herangehensweise an die Fragestellung besteht in der zweidimensionalen Gelelektrophorese, der Proteinfärbung und der anschließenden Auswertung der Färbeintensitäten, wobei die Expressionsmuster von Proben herzinsuffizienter und gesunder Versuchstiere miteinander verglichen werden.

Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine

Im Falle des Auftretens quantitativer veränderter Proteine, folgt für diese die Identifizierung. Sie erfolgt mittels Massenspektrometrie.

Charakterisierung der molekularen Veränderungen

Molekulare Veränderungen und Modifikationen auf zellulärer Ebene sollen durch die Betrachtung der Gesamtheit der differentiell exprimierten Proteine aufgedeckt und charakterisiert werden.

3. Methoden

3.1 Tiermodell

Um die Veränderungen des pulmonalen Proteoms in der manifesten Herzinsuffizienz anhand eines Tiermodells zu untersuchen bedarf es Versuchstieren, die zum Einen in der Herzinsuffizienz die gleichen Anpassungsvorgänge vollziehen wie der Mensch, und deren Lungenanatomie und –pathophysiologie zum Anderen größtmögliche Gemeinsamkeiten zu der des Menschen aufweist. Das Kaninchen erfüllt beide Kriterien. Es durchläuft in der Entwicklung der Herzinsuffizienz gleiche neurohumorale, strukturelle, funktionelle, hämodynamische und elektrophysiologische Veränderungen. Zudem imitiert es die Atemwegsanatomie mitsamt der Komplexität der Organstruktur und die pulmonale Pathophysiologie, wie die Freisetzung von Mediatoren und die Reaktion auf Botenstoffe. Die Körpergröße der Versuchstiere ermöglicht die adäquate Observanz der physiologischen Veränderungen in der Induktion der Herzinsuffizienz [11-15].

Für diese Arbeit wurden zwölf männliche Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard untersucht. Sechs Tiere wurden nach transvenöser Implantation eines Einkammerschrittmachers in die tachykardieinduzierte Herzinsuffizienz geführt, sechs unbehandelte dienten als Kontrollen.

3.1.1 Induktion der experimentellen Herzinsuffizienz

Die der Herzinsuffizienzgruppe angehörigen Tiere wurden dem Einbringen einer Herzschrittmachersonde in den rechten Ventrikel über einen transjugulären Zugang und der subkutanen Implantation des programmierbaren Aggregats unterzogen. Nach einer Rekonvaleszenzphase von mindestens sieben Tagen begann die progrediente Steigerung der Frequenzstimulation des rechten Ventrikels (V00-Modus). Die experimentelle Herzinsuffizienz wurde über 30 Tage induziert. Die Stimulationsfrequenz wurde in drei Phasen von jeweils 10 Tagen Dauer, die unmittelbar aufeinander folgten, stufenweise gesteigert. Die Stimulation erfolgte im ersten Zyklus mit 330/min, dann mit 360/min und zuletzt mit 380/min.

3.1.2 Evaluation durch Echokardiographie und hämodynamische Messungen

Zur Evaluation und Dokumentation der Entwicklung der Herzinsuffizienz wurden vor Beginn der Stimulation und nach jedem Stimulationszyklus die Diagnostika der Echokardiographie sowie Herzfrequenz- und Blutdruckmessung angewandt. Derselben Evaluation wurden die Kontrolltiere vor Euthanasie unterzogen.

Die Untersuchungen wurden unter leichter Sedierung mit 5mg Midazolam i.m. durchgeführt, Schrittmacherstimulation erfolgte währenddessen nicht. Die Bestimmung des Blutdrucks sowie der Herzfrequenz erfolgte durch invasive intraarterielle Messung über die A. auricularis media. Die Echokardiographie beinhaltete die Einstellung der langen und kurzen Achse von links parasternal mit dem Gerät HP Sonos 5500 der Marke Philips und einem 12 MHz-Schallkopf. Im 2D-gesteuerten M-Mode wurde aus jeweils dreimalig wiederholten Messungen der Mittelwert folgender Parameter bestimmt: linksatrialer Durchmesser (LA), enddiastolischer und endsystolischer linksventrikulärer Innendurchmesser (LVIDd, LVIDs), diastolische und systolische interventrikuläre Septumwanddicke (IVSd, IVSs) und linksventrikuläre Hinterwanddicke (LVPWd, LVPWs). Aus diesen Messungen erfolgte zudem die Errechnung der prozentualen systolischen Verkürzungsfraktion (fractional shortening, FS) zur Abschätzung der linksventrikulären systolischen Funktion. Zur Vermeidung von Interobservervariabilität wurden alle Untersuchungen von einem Untersucher durchgeführt.

3.2 Probenbereitung

3.2.1 Probenentnahme

Nach Euthanasie erfolgte zügig die Entnahme von Lungenteilgewebe über den Zugangsweg der medianen Thorakotomie. Das Gewebe wurde auf Eis weiter fraktioniert und in eiskalter steriler Kochsalzlösung von Blutrückständen gereinigt. Ein Teil der Gewebestücke wurde direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss weiter bei -80°C gelagert. Die übrigen Gewebestücke wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff pulverisiert. Kleine Mengen des entstandenen Pulvers wurden in 1,5mL-Gefäße überführt, mit 1mL Lysispuffer (2M Thiourea, 7M Urea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT, 2% (v/v) Pharmalyte (pH3-10), 10 mM Pefabloc Proteinase Inhibitor) bedeckt und der Inhalt ausreichend durchmischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde erfolgte die Zentrifugation bei 15°C mit 1400rpm für eine weitere Stunde. Der entstandene proteinhaltige Überstand wurde auf Eis aliquotiert, der Zelldetritus verworfen. Bis zu den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.2.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung des Proteingehalts der nach dem oben beschriebenen Verfahren vorbereiteten Proben erfolgte mit dem *2-D Quant Kit* der Firma GE Healthcare nach Anleitung des Herstellers. Die Proteinquantifizierung beruht auf der spezifischen Bindung von Kupferionen an die Proteine ohne Beeinflussung durch Störfaktoren (wie CHAPS, DTT und Thiourea). Die Menge der ungebundenen Kupferionen wird mittels einer Farbreaktion bestimmt. Nach Messung der Farbintensität mit dem Messgerät SpectraFluor Plus von Tecan bei einer Absorbanz von 485nm kann auf die Proteinkonzentration geschlossen werden, weil sich diese umgekehrt proportional zur Menge der ungebundenen Kupferionen und somit zur Farbintensität verhält.

3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Analysierung der aus Gewebeproben gewonnenen komplexen Proteingemische wurde die hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese angewendet. Bei dieser werden die Proteine in zwei Arbeitsschritten entsprechend zwei ihrer charakteristischen, voneinander unabhängigen Eigenschaften aufgetrennt. Die erste Dimension stellt die isoelektrische Fokussierung dar - die Auf trennung der Proteine entlang eines pH-Gradienten entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte. In der zweiten Dimension, der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), erfolgt die Auf trennung nach dem Molekulargewicht. Diese beiden Schritte werden orthogonal miteinander kombiniert. Nach Proteinanfärbung resultiert ein zweidimensionales Bild, in dem jeder Punkt einem Protein entspricht. Zudem sind daraus Informationen über den isolelektrischen Punkt eines Proteins, dessen Molekulargewicht sowie dessen Quantität in der untersuchten Probe ersichtlich.

Das im Folgenden dargestellte Protokoll orientiert sich an dem von Görg A. u.a. 2007 veröffentlichten Handbuch [16].

Es wurden zu jedem der 12 Tiere jeweils drei zweidimensionale Gele nach dem identischen Verfahren gefertigt und in die Auswertung einbezogen.

3.3.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Durchführung der ersten Dimension erfolgte mit dem *Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System* und dem entsprechenden Zubehör der Firma GE Healthcare sowie mit immobilisierten pH-Gradienten desselben Herstellers von 18 cm Länge, die einen nicht-linearen pH-Bereich von 3 bis 10 abdecken.

Vorbereitend wurde der Rehydratisierungspuffer hergestellt. Dafür wurden 6M Urea, 2M Thiourea und 1% Serdolit MB-1 mit Wasser unterhalb des gewünschten Endvolumens aufgefüllt und vermischt durch 10-minütiges Rühren. Diese Lösung wurde dann filtriert, 1% CHAPS zugesetzt und mit Wasser auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Puffer wurde in Aliquots à 1mL bei -80°C tiefgefroren und unmittelbar vor Gebrauch auf Eis aufgetaut. Um einen gebrauchsfertigen Puffer zu erhalten wurden pro Aliquot 12µL DeStreak Reagent und 5µL Pharmalyte 3-10 (entsprechend des pH-Gradienten der verwendeten Streifen) zugegeben.

Das angewandte Rehydratisierungsverfahren trägt den Namen sample in-gel rehydration, weil die Probe bereits vor der Rehydratisierung der IPG-Streifen dem Rehydratisierungspuffer zugefügt wird und sich somit ohne weiteres Handling die IEF an die Rehydratisierung anschließt.

Zunächst wurde das für jede Probe nötige Probenvolumen für ein Gesamtprotein von 1000µg berechnet, diese Menge zeigte in Vorversuchen beste Ergebnisse. Sie wurde mit dem gebrauchsfertigen Rehydratisierungspuffer auf ein Endvolumen von 350 µL aufgefüllt und dann als Flüssigkeitsstreifen zwischen die beiden Elektroden des Keramikhalters pipettiert, wobei für jede Probe ein Streifen vorgesehen und somit ein *Strip Holder* vorbereitet wurde. Die IPG-Streifen wurden dann in der vorgeschriebenen Ausrichtung ohne Einschluss von Luftblasen eingelegt. Zur Vermeidung von Verdunstung wurde der eingelegte Streifen vollständig mit *DryStrip Cover Fluid*, einem Mineralöl, überschichtet, wobei pro Keramikhalter 2mL perlkettenartig aufgetropft wurden. Durch Auflegen des transparenten Kunststoffdeckels wurde der Kontakt des Gels auch während und nach der Rehydratisierung, wenn es durch Aufquellen an Dicke zunimmt, mit den Elektroden im Keramikhalter gewährleistet.

Alle Keramikhalter – maximal sechs pro Lauf – wurden auf gleicher Höhe in das *Ettan IPGphor 3*-Gerät mit den entsprechenden Enden in den Elektrodenkontaktbereichen eingelegt und der Lauf nach Angabe der Anzahl der eingelegten Streifen nach unten stehendem Protokoll gestartet. Durch das Aufsetzen von Druckblöcken auf die Deckel der Keramikhalter ist nach Verschluss des Laufgeräts der ununterbrochene Kontakt zwischen Gel und Platinelektroden in den *Strip Holdern* sichergestellt, auch wenn das Gel durch die Rehydratisierung eine Dicke von 5mm erreicht. Der zunächst erforderliche Rehydratisierungsschritt erfolgte bei 50V für 16 Stunden nach dem Prinzip der aktiven Rehydratisierung, das heißt bei niedriger Spannung, die das Eindringen der Proteine, insbesondere höheren Molekulargewichts, in das Gel erleichtert. Es folgte, weil sample in-gel rehydration angewandt wurde, direkt die isoelektrische Fokussierung, in der die Spannung im elektrischen Feld stufenweise erhöht wurde und somit die Proteine im pH-Gradienten unter Einfluss des elektrischen Feldes ihren isoelektrischen Punkt aufsuchten – 500V für 2 Stunden und 15 Minuten, 1000V für 1 Stunde und 30 Minuten, kontinuierlicher Anstieg auf 8000V für 1 Stunde und schließlich 8000V für 3 Stunden. Im letzten Schritt waren 1000V für weitere 20 Stunden programmiert, was als Zeitpuffer diente,

währenddessen konnte der Lauf jederzeit gestoppt werden (Abbildung 2.1). Alle Schritte liefen bei konstanter Temperatur von 20°C ab.

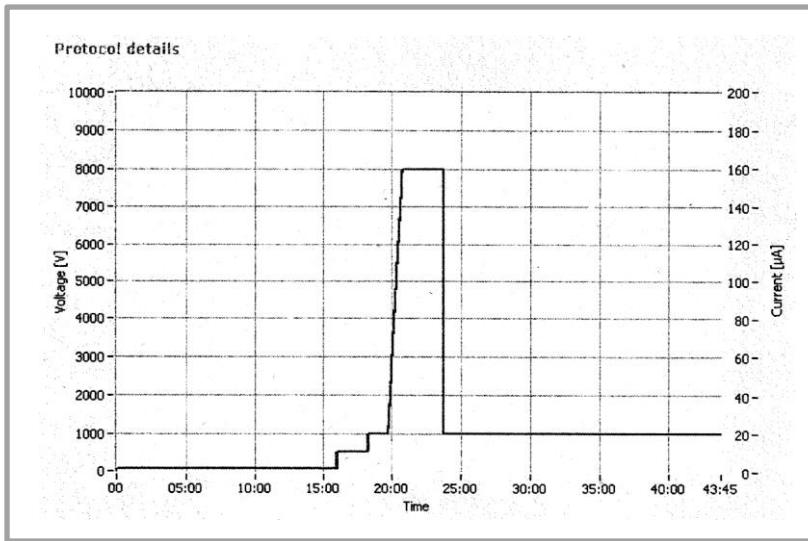


Abbildung 2.1 Protokoll der isoelektrischen Fokussierung
Erläuterungen siehe Text

Die Streifen wurden dann den Haltern entnommen, durch sanftes Abwaschen von überschüssigem *Cover Fluid* befreit und unmittelbar in der zweiten Dimension weiterverwendet.

3.3.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die Durchführung der zweiten Dimension erfolgte mit dem *Ettan DALTsix Large Vertical Electrophoresis System* mit dem entsprechenden Zubehör der Firma GE Healthcare. Das System enthält die Elektrophorese-Einheit (*Ettan DALTsix Electrophoresis Unit*) und benötigt eine externe Stromquelle und einen thermostatischen Zirkulator, wobei die vom Hersteller empfohlenen Geräte verwendet wurden – Electrophoresis Power Supply - EPS 601 von GE und Thermostatic Circulator MultiTemp III von Pharmacia Biotech. Zugehörig ist auch die Gießstation (*Gel Caster*) mit den entsprechenden Gießkassetten (*Ettan DALT Gel Casting Cassettes*).

Gießen homogener Gele

Zur Verwendung kamen in der zweiten Dimension selbst gegossene SDS-Polyacrylamidgele, die mit Hilfe der *Gel Caster*-Apparatur hergestellt wurden. Damit konnten in einem Arbeitsgang bis zu sechs circa 26cm x 20cm große Gele produziert werden.

Nach Reinigung der Gießplatten wurde die Gießstation entsprechend der Anleitung des Herstellers vorbereitet und auf einem Nivelliertisch waagerecht ausgerichtet.

Die Berechnung der Gelzusammensetzung erfolgte mit der in der Gebrauchsanweisung der verwendeten Acrylamid- und Bisacrylamidlösungen (Rotiphorese Gel A, 30%ige Acrylamidlösung, und Rotiphorese Gel B, 2%ige Bisacrylamidlösung, des Herstellers Carl Roth GmbH+Co.KG) dargestellten Formel für die gewünschte Gesamtgel- und Vernetzerkonzentration und der daraus resultierenden Porengröße. Für die angestrebte Gesamtgelkonzentration von T=12,5% und Prozentigkeit des Crosslinkers von C=3% wurde für ein Gesamtvolumen von 450mL, das für sechs Gele ausreichend ist, die folgende erforderliche Mischung errechnet: 182mL Rotiphorese Gel A, 84mL Rotiphorese Gel B, 63mL Millipore-Wasser, 113mL 1,5M Tris pH 8,8 und 4,5mL 10% SDS. Diese Lösungen wurden auf dem Magnetührgerät miteinander vermischt. Nach Zugabe von 2,3mL 10% APS, das bei -20°C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut wurde, und 225 μ L TEMED folgte nochmals ein kurzer Mischschritt. Dann wurden die Gele zügig unter Vermeidung der Entstehung von Luftblasen gegossen. Die Geloberkanten wurden sofort mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, das eine Glättung des oberen Gelrandes bei der Polymerisation bewirkt. Den Gelen wurde eine Polymerisationszeit von mindestens sechs Stunden gewährt.

Äquilibrierung der IPG-Streifen

Die Äquilibrierung der IPG-Streifen stellt den notwendigen Zwischenschritt zur Vorbereitung der Proteine auf den Übertritt vom IPG-Gel der ersten Dimension in das Polyacrylamidgel der zweiten Dimension dar. Sie muss unmittelbar vor dem Auflegen der IPG-Streifen auf das PA-Gel erfolgen und wird somit in diesem Gliederungspunkt als Teil der Methodenbeschreibung der zweiten Dimension erläutert.

Vorbereitend wurde der Äquilibrierungspuffer hergestellt, der aus 6M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS und 0,05M Tris HCl pH8,8 bestand. Er war zwei Wochen bei Raumtemperatur haltbar und es mussten 10mL pro IPG-Streifen pro Äquilibrierungsschritt eingeplant werden. Die Äquilibrierung erfolgte in zwei Schritten, wobei der Äquilibrierungspuffer kurz vor Gebrauch für den ersten Schritt mit 1,4-Dithiothreit (DTT) versetzt wurde und für den zweiten mit Iodacetamid (anstatt DTT). Dazu wurden für sechs Streifen 0,6g DTT und 2,4g Iodacetamid in jeweils 60mL des wie oben fertiggestellten Puffers gelöst. In beiden Schritten wurden die Streifen jeweils 15 Minuten in der jeweiligen Lösung auf dem Schüttelgerät geschwenkt. Anschließend wurden sie kurz in Millipore-Wasser eingetaucht und kurzzeitig bis zum Auflegen auf das 2D-Gel in befeuchtetes Whatman-Chromatographie-Papier eingelegt.

SDS-PAGE

Vorbereitend für die Elektrophorese wurde der 10xSDS-Elektrodenpuffer durch Auflösen von 58g Tris Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane), 300g Glycin und 20g SDS in Millipore-Wasser mit einem Endvolumen von zwei Litern hergestellt.

Nach Abschluss der Äquilibrierung wurden die IPG-Streifen stets in gleicher Ausrichtung auf die Geloberkante, die zuvor vom n-Butanol gereinigt worden war, aufgelegt. Mit Peqlab-Proteinstandard getränktes Blottingpapierzuschnitte (ca. 0,5cm x 1cm) wurden stets rechts der IPG-Streifen mit ihrer längeren Seite auf das PA-Gel aufgeschoben. Zuletzt wurde der Raum oberhalb der Geloberkanten zwischen den Glasplatten mit Agarose-Bromphenolblau-Lösung aufgefüllt. Sie diente dem besseren Kontakt zwischen den Gelen und als farbige Markierung in Form einer Bande zur Kontrolle des Fortschritts des Elektrophoreselaufs durch die transparenten Wände der Einheit.

Die beladenen Gelkassetten wurden in die bereits mit vier Litern 1x-SDS-Puffer befüllte untere Elektrophoresekammer eingesetzt und die obere Kammer aufgesetzt. Dann wurde die untere Kammer mit Hilfe eines Trichters, der die Flüssigkeit an der oberen Kammer vorbei und nur in die untere leitete, mit 1xSDS-Elektrodenpuffer, dem Anodenpuffer, noch weiter bis zur an der Wand markierten Maximalgrenze aufgefüllt. Die obere Kammer wurde mit 2xPuffer, Kathodenpuffer, ebenso hoch befüllt wie die untere. Durch Aufsetzen des Deckels wurde der Stromkreis geschlossen. Nach Anschluss des Systems an die externe Stromquelle EPS 601 und dessen Programmierung auf 600V, 400mA und 1,5W pro Gel, also 9W für einen mit sechs Gelen vollbesetzten Lauf, wurde die Elektrophorese gestartet. Wenn die Lauffront aus der Bromphenolblaulösung gerade am Gelunterrand ausgelaufen war, wurde der Lauf gestoppt. Die Laufzeiten umfassten somit von 16 Stunden und 45 Minuten bis 17 Stunden und 45 Minuten.

Nach Beendigung des Laufs wurden die Gelkassetten nacheinander entnommen und liegend geöffnet sowie die Agaroseüberschichtung und die IPG-Streifen abgenommen, um dann die Gele in die Fixierlösung entsprechend der nachfolgenden Färbung zur Proteindetektion zu transferieren.

Die verwendete Einheit sowie die Glasplatten der Gelkassetten wurden nach Gebrauch gereinigt und luftgetrocknet.

3.4 Proteindetektion mit kolloidaler Coomassie-Färbung

Zur Detektion der von Natur aus farblosen Proteine in den Polyacrylamidgelen wurde die kolloidale Coomassie-Brillantblau-G250-Färbung verwendet, die mit hoher Spezifität an die Proteine bindet, aber nur geringfügig an die Gelmatrix [17, 18]. Außerdem ist dieses Verfahren kompatibel mit der intendierten Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie [16].

Nach dem im vorangegangenen Gliederungspunkt beschriebenen Abschluss der SDS-PAGE wurden die Gele unmittelbar der Färbung zugeführt. Zur Durchführung wurde stets eine Melaminschale – in Form und Größe zu den Gelen passend – für ein einzelnes Gel verwendet und es wurde jeweils 2000mL Lösung pro Arbeitsschritt für die Färbung von sechs Gelen hergestellt, wobei das Volumen gleichmäßig auf die Gele verteilt wurde. Die Inkubation erfolgte bei allen Schritten bei Raumtemperatur und auf einem Horizontalschüttler, der die Gele in der jeweiligen Lösung mit ungefähr 100 bis 150 Umdrehungen pro Minute schwenkte. Die erste Lösung, die Fixierlösung, bestand aus 1580mL Millipore-Wasser, 20mL Ortho-Phosphorsäure $\geq 85\%$ und 400mL Methanol, worin die Gele für mindestens drei Stunden geschwenkt wurden um Bindungen zu eliminieren, die die folgende Färbung beeinflussen könnten [18]. Anschließend wurden die Gele über Nacht für mindestens 15 Stunden in Färbelösung geschüttelt, die aus 1200mL Wasser, 400mL Methanol und 400mL RotiBlue 5x-Konzentrat der Firma Carl Roth bestand, wobei die Farbstoffe an die Proteine banden. Vor dem Überführen der Gele in die Waschlösung wurden sie in frischen Melaminschalen mit Millipore-Wasser zweimal gewaschen um sie von überschüssigen Farbpartikeln zu befreien. Anschließend wurden die Gele in diesen sauberen Schalen in Waschlösung (25% Methanol) je nach gewünschter Intensität der Färbung für eine bis eineinhalb Stunden geschüttelt bis eine minimale Hintergrundfärbung bei optimaler Proteinfärbung erreicht war. Die Lagerung der Gele erfolgte in 1% Essigsäure bei 4°C.

3.5 Computerassistierte Auswertung

Der erste Schritt zur computerassistierten Auswertung der zweidimensionalen Proteinmuster ist die Erfassung der Gele im digitalen Format. Dazu wurde der ImageScanner III der Firma GE Healthcare mit der zugehörigen Software Labscan 6.0 verwendet. Nach dem Einscannen (General Parameter: Mode: Transparent; Scan Parameter: Resolution 300dpi, Color: Red filter) der einzelnen Gele wurden sie unter Verwendung der eindeutigen Identifizierungsnummer des zugehörigen IPG-Streifens abgespeichert. Alle Gele wurden jeweils noch am Tag der Beendigung ihrer Färbung digital erfasst.

Zur Analyse der Spotmuster wurde das Programm Melanie (2D Gel Analysis Software) angewendet, das vom Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) in Zusammenarbeit mit Geneva Bioinformatics (GeneBio) entwickelt wurde.

Darin importiert, wurden die gespeicherten Gelbilder zunächst auf gleiche Größe zugeschnitten. Dann erfolgte die automatische Spotdetektion. Zur Optimierung dieser war die manuelle Nachbearbeitung notwendig, die nur dann vorgenommen wurde, wenn eine fehlerhafte Spotidentifizierung der automatischen Programmfunction eindeutig und sicher war.

Im Anschluss wurden sogenannte „Landmarks“ gesetzt - manuell eingefügte Orientierungspunkte, die identische Punkte kennzeichnen, die auf jedem Gel in derselben Lokalisation vorhanden und nicht differentiell exprimiert sind. Die gleichmäßige Verteilung dieser über die gesamte Gelfläche ermöglicht dem Programm die anderen Spots automatisch einander zuzuordnen. Dieses sogenannte „matching“ wurde genau nachkontrolliert und bei eindeutigem Bedarf manuell bearbeitet.

Als die richtigen Entsprechungen der Spots feststanden, wurden die differentiell exprimierten daraus ermittelt. Dazu legte das Programm eine Tabelle an, die alle Spots einer eindeutigen Identifizierungsnummer (Match ID) zuordnet, die Intensitäten der Spots in den beiden Gruppen CTRL und CHF durch Berechnung aus den einzelnen, sich entsprechenden Punkten zusammenfasst und nebeneinander stellt, sowie die Unterschiede in der Proteinexpression durch Berechnung darstellt. Zusätzlich konnten graphische Darstellungen, zum Beispiel in Diagrammform, aufgerufen werden. So wurden die signifikant unterschiedlich exprimierten Spots aus den Gelbildern, der Tabelle sowie

anhand der von der Software angebotenen Hilfestellungen ermittelt und als solche gekennzeichnet.

3.6 Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie

Die Identifizierung der in den Gelen als differentiell exprimiert gefundenen Proteine fand mittels Massenspektrometrie statt. James P. u. a. erklären die Methode 1993 mit dem bildlichen Vergleich der Identifizierung des Proteins über seinen Fingerabdruck. Durch den im Folgenden beschriebenen, der Massenspektrometrie vorgeschalteten Enzymverdau entsteht ein Molekulargewichtsprofil des Proteins, charakterisiert durch die einzelnen Peptide, in die es zerlegt wurde. Dieses Profil ist der Fingerabdruck, über welchen das ursprüngliche Protein eindeutig mittels der Suche in Datenbanken identifiziert werden kann. Dieses Verfahren stellt eine schnelle und hochsensitive Methode dar zur Verbindung der Proteindetektion nach Auftrennung eines Gewebelysats in großen zweidimensionalen Gelen mit der Proteinidentifizierung [19, 20].

3.6.1 Proteinverdau

Vor Zuführen der Proteine zur massenspektrometrischen Identifizierung ist die folgende Vorbereitung nötig. Die Lagerungslösung von Gelen, die über einen längeren Zeitraum als einen Tag gelagert wurden, bestand aus 1% Essigsäure. Bei kürzerer Lagerung erfolgte diese in Millipore-Wasser. Zunächst wurden die Gele, die zur Gewinnung von Proteinmaterial bestimmt wurden, zur Reinigung von ihrer Lagerungslösung mehrfach in Millipore-Wasser gewaschen.

Die Exzision der zu identifizierenden Spots sowie einer Positiv- und einer Negativkontrolle aus dem Gel erfolgte mit Hilfe einer gekürzten Pipettenspitze. Die Gelstücke wurden jeweils in 0,5mL Behälter abgeworfen. Sie werden zunächst nochmals mehrfach in Millipore-Wasser gewaschen. Dann schließen sich weitere Waschschritte mit je 100 μ L 50mM NH₄HCO₃, 50mM NH₄HCO₃/Acetonitril (3Teile/1Teil), 25% Acetonitril und 50% Acetonitril an, die jeweils unter leichtem Schütteln (800rpm) bei 25 °C für 30 Minuten durchgeführt werden. Es schließt sich das Trocknen der Gelstückchen bei 37°C für eine Stunde an. Im Folgenden werden zu Beginn des Trypsinverdaus schritts jeweils 10 μ L der Proteinaselösung hinzupipettiert und für mindestens 10 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Proteinaselösung wurden zuvor 25 μ g Trypsin in 180 μ L 1mM HCl gelöst, als 15 μ L-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20°C gelagert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung kurz vor Verwendung werden zu jedem Aliquot 35 μ L 100mM NH₄HCO₃ pipettiert. Es folgen drei Extraktionsschritte mit jeweils 100 μ L Lösung für eine Stunde unter leichtem Schütteln (800rpm) bei 25°C –

zweimalig mit 100mM NH₄HCO₃, im Anschluss einmalig mit 100mM NH₄HCO₃/Acetonitril (1:1). Die Extrakte werden jeweils vereinigt und der Massenspektrometrie zugeführt.

3.6.2 Massenspektrometrie und Datenbankabgleich

Die Durchführung der Massenspektrometrie erfolgte durch den Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg (Lehrstuhlinhaber Prof. Dr. G. Meister) durch Prof Dr. R. Deutzmann und E. Hochmuth.

Vor der Massenspektrometrie wurde die zweimalige Lyophilisierung der zusammengeführten Extrakte mit einem zwischengeschalteten Resuspensionsschritt mit jeweils 50µL H₂O durchgeführt um NH₄HCO₃ als Störfaktor zu eliminieren. Verwendung fand die MALDI(matrix-assisted laser desorption/ ionization)- und die Tandem-(MS/MS)-Massenspektrometrie mit dem Massenspektrometer 4800 Proteomics Analyzer und der v3.5.3 4000series explorer Software (AB Sciex). Unter Verwendung der Suchmaschine Mascot (v2.1, Matrix Science) wurden die resultierenden Peptidfingerabdrücke mit der NCBI(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA)-Datenbank und den Uniprot (www.uniprot.org)-Datenbanken abgeglichen. Ein Mascot-Proteinscore >85 ist als Kriterium für eine verlässliche Proteinidentifizierung zu sehen, die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses ist oberhalb dieses Wertes kleiner als 5 % (p<0,05).

3.7 Validierung mit Western Blot

Für ausgewählte, mit den oben genannten Methoden bereits identifizierten, differentiell exprimierten Proteinen schloss sich abschließend die Validierung der Ergebnisse mittels Western Blot-Verfahren an.

Western Blot ist eine Methode, die seit über drei Jahrzehnten zur gezielten Detektion bestimmter Proteine aus einer komplexen Proteinmischung angewendet wird. Sie wurde erstmals 1979 durch Towbin u.a. beschrieben [21]. Die Bestätigung der Ergebnisse, die aus der Untersuchung eines Proteoms mittels zweidimensionaler Elektrophorese und Massenspektrometrie gewonnen wurden, durch eine weitere unabhängige Methode wie Western Blot ist ein gängiges und etabliertes Verfahren [22]. Das Western Blot-Verfahren beruht auf drei wesentlichen Elementen: Die Proteinauftrennung nach Molekulargewicht, die Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran und die Detektion und Visualisierung des gewünschten Proteins mittels Antikörperbindung [23].

Das Verfahren wurde für zwei Proteine angewandt. Die Validierung der Expressionsunterschiede weiterer Proteine wurde versucht, war in Ermangelung funktionierender Antikörper allerdings nicht erfolgreich. Die verfügbaren Antikörper sind in ihrer Reaktivität zumeist nicht spezifisch auf Kaninchengewebe ausgerichtet.

Als Proben wurde jeweils Material eines herzinsuffizienten und eines gesunden Tieres eingesetzt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit 10µL Ladepuffer (50µL β -Mercaptoethanol ad 950µL BioRad 2x Laemmli Sample Buffer für ein Gesamtvolumen von 100µL) versetzt und mit Milliporewasser auf das gewünschte Volumen von 20µL aufgefüllt. Dann erfolgte die Erhitzung auf 95°C für 10 Minuten, wobei jeweils vor und nach diesem Schritt kurz zentrifugiert wurde. Bis zur baldigen Verwendung wurden die so vorbereiteten Proben auf Eis gelagert.

Das Gießen der Gele erfolgte in der BioRad Minigelapparatur. Nach gründlicher Säuberung der Glasplatten zur Vermeidung von Gelunebenheiten erfolgte der Aufbau des Gießstandes auf ebener Fläche. Die Zusammensetzung der Trenngele wurde mit dem Zielpolyacrylamidgehalt von 12% berechnet. Für vier Gele wurden 5mL 1,5M TRIS pH 8,8, 200µL 10% SDS, 6,6mL Milliporewasser und 8mL Acrylamid 37,5:1 vermischt. Nach Hinzufügen von 10µL TEMED (N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin) und 200µL 10% APS (Ammoniumpersulfat/ Ammoniumperoxodisulfat) unter kontinuierlichem

Mischvorgang wurde die Lösung in die vorbereitete Apparatur gefüllt. Um bei der Polymerisation einen glatten oberen Gelrand zu erhalten erfolgte die zügige Überschichtung mit wassergesättigtem n-Butanol. Der Polymerisationsvorgang dauerte 30 Minuten. Im Anschluss wurden die Trenngele mit Wasser vom Butanol gereinigt. Für vier Sammelgele wurde folgende Lösung vorbereitet: 2,5mL 0,5M TRIS pH 6,8, 100µL 10% SDS, 5,6mL Milliporewasser, 1,7mL Acrylamid 37,5:1. Unter kontinuierlichem Mischvorgang wurden 20µL TEMED und 160µL 10% APS hinzugefügt. Nach Gießen der Sammelgele auf den Oberrand der polymerisierten Trenngele in der Minigelapparatur wurde zügig ein Kamm zur Bildung der Sammeltaschen eingelegt. Die Polymerisationsdauer betrug wiederum 30 Minuten.

Nach Abschluss des Polymerisationsvorgangs wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x SDS-Tris-Glycinpuffer (100mL 10x SDS-Tris-Glycinpuffer ad 900mL Milliporewasser für ein Gesamtvolumen von 1000mL) befüllt. Nach Spülung der Sammeltaschen mit etwas Puffer wurden die wie oben vorbereiteten Proben und ein Proteinstandard geladen. Die Auf trennung erfolgte zunächst bei 25mA, bis die Probenreihen unterhalb der Sammeltaschen erkennbar waren, für etwa 15 Minuten, und dann bei 35mA.

Nach beendetem Lauf wurden die Sammelgele verworfen und die Trenngele sowie die auf die Größe der Trenngele zugeschnittenen 1mm dicken Blottingpapiere in Transferpuffer (100mL 10x Tris-Glycinpuffer, 200mL Methanol und 700mL Milliporewasser für ein Gesamtvolumen von 1000mL) eingelegt. Die ebenso zugeschnittene PVDF-(Polyvinylidenfluorid-)Membran wurde für 5 Minuten in 100% Methanol eingelegt und anschließend zweimalig in Transferpuffer gewaschen. Die Vorbereitung des Transfers beinhaltete die Anordnung der Gele auf ihrer jeweiligen PVDF-Membran zwischen Blottingpapieren auf der Bodenplatte des Blottinggeräts. Nach leichter ebenmäßiger Kompression zur Entfernung von Luftbläschen zwischen Gel und Membran wurde die Gerätschaft verschlossen und das Blottingverfahren gestartet. Der Proteintransfer erfolgte mit 0,8mA/cm² für 1,5 Stunden. Zur Kontrolle des Transfererfolgs wurde die Membran mit Ponceau Rot angefärbt.

Das Blocken erfolgte mit 5% BSA (bovines Serumalbumin) in TTBS (Tween 20/ Tris Buffered Saline Puffer) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeiten betrugen für den primären Antikörper über Nacht bei einer Temperatur von 4°C sowie 1 Stunde für den sekundären bei Raumtemperatur. Die Verdünnung der Antikörper sowie der

prozentuale BSA-Gehalt der TTBShaltigen Inkubationslösung erfolgten nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers. Vor dem ersten und jeweils im Anschluss an die Antikörperbindungsschritte wurden Waschschritte in TTBS durchgeführt.

Die *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents* der Firma GE Healthcare wurden zur anschließenden Elektrochemielumineszenz nach Anleitung des Herstellers angewandt. In der Dunkelkammer wurde zunächst ein Film (*Amersham Hyperfilm ECL*, GE Healthcare) auf den Blot aufgelegt - die Dauer wurde je nach gewünschter Intensität festgelegt - und anschließend entwickelt. Die Erfassung der Filme im digitalen Format wurde mit dem ImageScanner III der Firma GE Healthcare mit der zugehörigen Software Labscan 6.0 (Einstellungen: Mode: Transparent; Scan Parameter: Resolution 300dpi, Color: Red filter) durchgeführt.

3.8 Vorarbeiten

Nach dem Erlernen grundlegender Labortätigkeiten und der Verfahrensschritte der zweidimensionalen Gelelektrophorese fanden Vorversuche bezüglich der Färbung zur Proteindetektion statt. Ziel war die Etablierung einer im Vergleich zur kolloidalen Coomassie-Färbung sensitiveren Silbernitratfärbung bei einer zugleich bestehenden Kompatibilität mit der anschließenden Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie. Dabei wurden mehrere Silbernitratfärbungen getestet, deren Protokolle mehrfach modifiziert wurden. Schließlich wurden zwei etabliert, die eine geringgradig höhere Sensitivität zeigten. Allerdings konnten die detektierten Proteine aus beiden Färbungen in der Massenspektrometrie nicht identifiziert werden. In Abwägung der nur geringgradig höheren Spotausbeute auf dem zweidimensionalen Gel mit der Inkompatibilität mit der anschließenden Proteinidentifizierung fiel die Entscheidung zur Verwendung der kolloidalen Coomassie-Färbung, die das Kriterium der Sensitivität ausreichend erfüllt und MS-kompatibel ist.

Es schlossen sich weitere Vorversuche zur Festlegung der optimalen Proteinmenge zum Einsatz in der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit anschließender Proteindetektion mittels kolloidaler Coomassie-Färbung an. Optimale Ergebnisse bezüglich Quantität der detektierten Spots und Qualität deren Abgrenzung voneinander wurden mit einer eingesetzten Gesamtproteinmenge von 1000 μ g erzielt.

3.9 Eigenanteil

Das beschriebene Modell der experimentellen Herzinsuffizienz ist in der Forschungsgruppe etabliert. Die oben erwähnten Operationen und diagnostischen Schritte sind hoch spezialisiert und wurden durch den Betreuer bzw. den Doktorvater vorgenommen. Dennoch war eine persönliche Mitarbeit bei der Evaluation der Herzfunktion durch Echokardiographie, bei den hämodynamischen Messungen und bei der Probenentnahme aufgrund der Laufzeit des Projektes noch bei einem Teil der Versuchstiere möglich.

Die Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie erfolgte am Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg.

Alle weiteren beschriebenen Verfahrensschritte - die Proteinquantifizierung, die zweidimensionale Gelelektrophorese, die Proteinfärbung, die softwaregestützte Auswertung, der Proteinverdau zur Vorbereitung der Massenspektrometrie und die Validierung durch Western Blot - wurden, ebenso wie die genannten Vorarbeiten, selbstständig und eigenhändig durchgeführt. Ein Teil der proteinanalytischen Arbeiten wurde durch den Betreuer wiederholt und verifiziert.

4. Material

4.1 Chemikalien

1,4-Dithiothreit, ≥99%, p.a.	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
10x Tris/Glycin Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
1-Butanol ≥99,5%, zur Synthese	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol für die Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2x Laemmli Sample Buffer	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Acetonitrile, gradient grade for liquid chromatography	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose, low EEO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Albumin, Fraktion V, biotinfrei, ≥98%, BSA	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium persulfate, for electrophoresis ≥98%	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat ≥98% p.a., ACS	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
CHAPS, Pufferan ≥98%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
DeStreak Reagent	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Essigsäure 100%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, Absolute	J. T. Baker, Center Valley, PA, USA
Glycerin ROTIPURAN ≥99,5%, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol, for electrophoresis, ≥99%	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Glycin für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Iodoacetamide, BioChemika	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Iodoacetamide, SigmaUltra	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
IPG Buffer pH 3-10	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Methanol, gradient grade for liquid chromatography	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin, BioChemika, for electrophoresis	Fluka, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Natriumcarbonat, wasserfrei ≥99,8% p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat, wasserfrei ≥99% p.a.	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure, ≥85%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pefabloc SC (AEBSF)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
peqGOLD Protein Marker IV	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pharmalyte 3-10 for IEF	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Reinstwasser, Widerstand 18MΩcm	aus Reinstwasseraufbereitungssystem Millipore Q-Pod, ZMQSP0D01, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Roti-Blue 5x Konzentrat	<i>synonym:</i> Millipore-Wasser, Typ-1-Wasser Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel A, 30%ige Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel B, 2%ige Bisacrylamidlösung	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS-Tris-Glycin-Puffer (10x) BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Serdolit MB-1 analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate, SigmaUltra, minimum 99% GC.	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Thiourea	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
TRIS Ultra Qualität, tris- (hydroxymethyl)-aminomethane	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin Sequencing Grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Urea cristalline Molecular biology grade	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

4.2 Kits

2-D Quant Kit

GE Healthcare, Chalfont St Giles,
Buckinghamshire, UK

Amersham ECL Western Blotting
Detection Reagents

GE Healthcare, Chalfont St Giles,
Buckinghamshire, UK

4.3 Lösungen

10x SDS-Elektrodenpuffer (Stocklösung) (2000mL)	58g Tris Base (Tris- (hydroxymethyl)- aminomethane) 300g Glycin 20g SDS Typ-1-Wasser zum Endvolumen=2000mL
Äquilibrierungspuffer I	6M Urea 30% (w/v) Glycerol 2% (w/v) SDS 0,05M Tris HCl (pH 8,8) 1% (w/v) DTT 6M Urea 30% (w/v) Glycerol 2% (w/v) SDS 0,05M Tris HCl (pH 8,8) 8% (w/v) Iodoacetamid 1200mL Typ-1-Wasser 400mL Methanol 400mL RotiBlue 5x-Konzentrat 1580mL Typ-1-Wasser 20mL Ortho-Phosphorsäure ≥85% 400mL Methanol 50µL β-Mercaptoethanol 950µL BioRad 2x Laemmli Sample Buffer 1% Essigsäure (20mL) Typ-1-Wasser (1980ml) 2M Thiourea 7M Urea 4% (w/v) CHAPS 1% (w/v) DTT 2% (v/v) Pharmalyte (pH3-10) 10 mM Pefabloc Proteinase Inhibitor 2µg Trypsin 15µL 1mM HCl 35µL 100mM NH ₄ HCO ₃ 6M Urea 2M Thiourea 1% Serdolit MB-1 1% CHAPS 1,2% DeStreak Reagent 0,5% Pharmalyte 3-10 100mL 10x Tris-Glycinpuffer 200mL Methanol 700mL Typ-1-Wasser 50mM Tris 150mM NaCl 0,05% Tween 20 25% Methanol (500mL) ad Typ-1-Wasser (1500mL)
Äquilibrierungspuffer II	
Färbelösung der kolloidalen Coomassie-Färbung (2000mL)	
Fixierlösung der kolloidalen Coomassie-Färbung (2000mL)	
Ladepuffer für Western Blot (100µL)	
Lagerungslösung der kolloidalen Coomassie-Färbung (2000mL)	
Lysispuffer	
Proteinaselösung (50µL)	
Rehydratisierungspuffer	
Transferpuffer für Western Blot (1000mL)	
TTBS	
Waschlösung der kolloidalen Coomassie-Färbung (2000mL)	

4.4 Polyacrylamidgele

2D-Gel (12,5% Acrylamidgehalt) (450mL)	30% Acrylamidlösung (182mL Rotiphorese Gel A) 2% Bisacrylamidlösung (84mL Rotiphorese Gel B) Typ-1-Wasser (63mL) 1,5M Tris pH 8,8 (113mL) 10% SDS (4,5mL) APS (2,3mL) TEMED (225µL)
Sammelgel (Western Blot)	2,5mL 0,5M TRIS pH 6,8 100µL 10% SDS 5,6mL Typ-1-Wasser 1,7mL Acrylamid 37,5:1 20µL TEMED 160µL APS
Trenngel (Western Blot) (12% Acrylamidgehalt)	5mL 1,5M TRIS pH 8,8 200µL 10% SDS 6,6mL Typ-1-Wasser 8mL Acrylamid 37,5:1 10µL TEMED 200µL APS

4.5 Verbrauchsmaterial

597 ½ Folded Filters	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
5mL Syringe Luer-Lok Tip	BD, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Amersham Hyperfilm ECL 8x10 inches	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK
Chromatography Paper, Whatman, 3MM Chr, 46x57cm	Whatman International Ltd., Maidstone, England, Great Britain
Immobiline DryStrip, pH 3-10NL, 18cm	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
KimtechScience Precision Wipes	Kimberly-Clark Corporation, Irving, TX, USA
Microtest Plate 96-Well, Flat Bottom	Sarstedt AG & Co., Newton, NC, USA
Miraject, Sterile Dental-Einweginjektionskanülen mit Kunststoffkonus Luer	Hager & Werken GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland
Parafilm Verschlussfolie	American National Can Company, Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen Combitips, verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S., verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Pipetman, verschiedene Größen	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen Premium Tips, verschiedene Größen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Plus One Dry Strip Cover Fluid Röhre 15mL, 120x17mm, PP	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Rotilabo-Blottingpapier 1,0mm; 200x200mm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Roti-PVDF, Transfermembran 26cmx3m	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäß 2mL	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Safe-Lock Tubes 0,5mL, 1,5mL, 2,0mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 2mL, 5mL, 10mL, 25mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Strip Holder Cleaning Solution	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten – Einmal-Pasteurpipetten 3,5mL	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Zentrifugenröhre 50mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

4.6 Antikörper

Primärantikörper (Western Blot):

INMT polyclonal antibody (A01)

YWHAE polyclonal antibody (A01)

Abnova , Taipei, Taiwan

Abnova , Taipei, Taiwan

Sekundärantikörper (Western Blot):

Polyclonal Rabbit Anti-Mouse

Immunglobulins, P0260

Dako, Glostrup, Denmark

4.7 Geräte und Software

4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer	AB Sciex, Framingham, MA, USA
Blockthermostat BT 1301	
Centrifuge 5417R	
Electrophoresis Power Supply – EPS 601	
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra Cell	HLC by DIBATIS Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim, Deutschland
Ettan DALT gel casting cassettes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ettan DALTsix Electrophoresis Unit	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Great Britain
Ettan DALTsix Gel Caster	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ettan IPGphor 3 control software	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Great Britain
Ettan IPGphor Ceramic Strip Holders	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Great Britain
HP Sonos 5500 ultrasound system	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Great Britain
Image Scanner III	Philips N.V., Amsterdam, Niederlande
Isoelektrische Fokussierungseinheit, Ettan IPGphor 3	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Great Britain
LabScan Version 6.0.1.0	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Great Britain
Magnetührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Magnetührer RCTbasic	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Melanie Version 7.0.6	Geneva Bioinformatics (GeneBio) SA, Genf, Schweiz
Microplate Reader SpectraFluor Plus	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Multipette 4780	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Netzgerät Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
PerfectBlue Semi-Dry-Elektroblotter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter FE-20 FiveEasy pH	Mettler Toledo Inc., Columbus, OH, USA
Powerpette	Jencons Scientific, LLC, Franklin, TN, USA
Präzisionswaage LA620 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungssystem Millipore Q-Pod, ZMQSP0D01	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schüttelgerät 3005	GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

Schüttelmaschine REAX 2000

Thermomixer comfort

Thermostatic Circulator, MultiTemp III

v3.5.3 4000 Series Explorer Software

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Schwabach, Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pharmacia Biotech, GE Healthcare,
Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Great
Britain

AB Sciex, Framingham, MA, USA

5. Ergebnisse

5.1 Kardiale Anpassungsvorgänge in der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz

Die beschriebene Frequenzstimulation zur Induktion der Herzinsuffizienz führte zu morphologischen und funktionellen Anpassungsvorgängen.

Die invasiven hämodynamischen Messungen zeigten einen signifikanten Abfall des systolischen Blutdrucks bei den herzinsuffizienten Tieren im Vergleich zu den herzgesunden ($68,11 \pm 9,37$ vs. $88,40 \pm 17,52$ mmHg, CHF vs. CTRL, $p > 0,05$). Ebenso zeigte der diastolische Blutdruck im Vergleich eine abfallende Tendenz ($58,99 \pm 11,48$ vs. $70,40 \pm 14,52$ mmHg, CHF vs. CTRL), die Herzfrequenz entsprechend eine ansteigende (247 ± 23 vs. 235 ± 19 /min, CHF vs. CTRL), allerdings erreichten diese beiden Werte nicht das Signifikanzniveau.

In der Echokardiographie waren als Zeichen der linksventrikulären Dilatation bei den herzinsuffizienten Tieren die linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Innendurchmesser signifikant vergrößert (LVIDs $12,1 \pm 1,1$ vs. $7,9 \pm 1,1$ mm und LVIDd $16,3 \pm 0,8$ vs. $13,7 \pm 1,2$ mm, je CHF vs. CTRL, je $p < 0,05$). Die muskuläre Herzwanddicke nahm entsprechend signifikant ab (LVPWs $2,9 \pm 0,4$ vs $3,8 \pm 0,5$ mm, LVPWd $2,4 \pm 0,3$ vs. $2,8 \pm 0,2$ mm und IVSs $3,3 \pm 0,3$ vs. $4,1 \pm 0,7$ mm, je CHF vs. CTRL, je $p < 0,05$). Die prozentuale systolische Verkürzungsfraktion (FS, Fractional Shortening) zeigte einen signifikanten Abfall ($26,18 \pm 4,53$ vs. $41,40 \pm 3,53\%$, CHF vs. CTRL, $p < 0,05$), was, ebenso wie die bereits beschriebene Veränderung des systolischen Blutdrucks bei den hämodynamischen Messungen, die linksventrikuläre systolische Funktionseinschränkung beschreibt.

Den Durchmesser des linken Atriums betreffend konnte eine signifikante Vergrößerung quantifiziert werden ($16,1 \pm 1,6$ vs. $12,0 \pm 0,8$ mm, CHF vs. CTRL, $p < 0,05$). Zudem entwickelten herzinsuffiziente Tiere eine signifikante rechts- und linksatriale Hypertrophie, die sich als Gewichtzunahme der Vorhöfe quantifizieren lässt (LA $0,30 \pm 0,08$ vs. $0,14 \pm 0,03$ g/kg KG, RA $0,18 \pm 0,03$ vs. $0,10 \pm 0,02$ g/kg KG, je CHF vs. CTRL, je $p < 0,05$) als Hinweis auf erhöhte intraatriale Drücke und pulmonalvenöse Stauung.

Diese Ausführungen der kardialen Anpassungsvorgänge, die in der Tabelle 4.1. zusammengefasst sind, vergleichen die Messungen von zwei Populationen – Kontrolltiere

versus herzinsuffiziente Tiere. Ähnliche Daten wurden beim Vergleich innerhalb der CHF-Gruppe zu zwei verschiedenen Zeitpunkten – vor Beginn der Frequenzstimulation versus in der manifesten Herzinsuffizienz nach Abschluss des Stimulationsprotokolls – erhoben.

	CHF (n=6)	CTRL (n=6)
<i>Hämodynamik</i>		
Herzfrequenz [1/min]	247±23	235±19
systolischer Blutdruck [mmHg]	68,11±9,37	88,40±17,52*
diastolischer Blutdruck [mmHg]	58,99±11,48	70,40±14,52
<i>Echokardiographie</i>		
LVIDs [mm]	12,1±1,1	7,9±1,1*
LVIDd [mm]	16,3±0,8	13,7±1,2*
LVPWs [mm]	2,9±0,4	3,8±0,5*
LVPWd [mm]	2,4±0,3	2,8±0,2*
IVSs [mm]	3,3±0,3	4,1±0,7*
IVSd [mm]	2,6±0,2	2,9±0,5
FS [%]	26,18±4,53	41,40±3,53*
LAD [mm]	16,1±1,6	12,0±0,8*
<i>Gewichte</i>		
LA [g/kg KG]	0,30±0,08	0,14±0,03*
RA [g/kg KG]	0,18±0,03	0,10±0,02*
LV [g/kg KG]	0,66±0,13	0,66±0,12
RV [g/kg KG]	0,40±0,11	0,35±0,10
Körpergewicht [kg]	3,83±0,32	4,23±0,35

Tabelle 4.1 Kardiale Anpassungsvorgänge

Herzinsuffiziente (CHF) versus Kontrolltiere (CTRL) ; n: Anzahl Tiere; Median±Standardabweichung; *: signifikant, $p<0,05$; LVIDs: linksventrikulärer endsystolischer Innendurchmesser; LVIDd: linksventrikulärer enddiastolischer Innendurchmesser; LVPWs: linksventrikuläre systolische Hinterwanddicke; LVPWd: linksventrikuläre diastolische Hinterwanddicke; IVSs: interventrikuläre systolische Septumwanddicke; IVSd: interventrikuläre diastolische Septumwanddicke; FS: Fractional Shortening (prozentuale systolische Verkürzungsfraktion); LAD: linksatrialer Durchmesser; LA: linkes Atrium, RA: rechtes Atrium; LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel.

5.2 Analyse des pulmonalen Proteoms im zweidimensionalen Bild

Nach den oben beschriebenen Verfahren der Probenvorbereitung, Gelelektrophorese und Proteinfärbung erhält man aus Lungengewebe das zweidimensionale Abbild des pulmonalen Proteoms. Ein Gel ist exemplarisch in der Abbildung 4.1 dargestellt. In der horizontalen Achse ist die Auftrennung entlang des pH-Gradienten von pH 3 bis 10 dargestellt und die Lage des IPG-Streifens entsprechend eingezeichnet. In der vertikalen Achse ist die Separation der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ersichtlich, mittels des Proteinstandards in der zweiten Dimension ist dieses quantifizierbar.

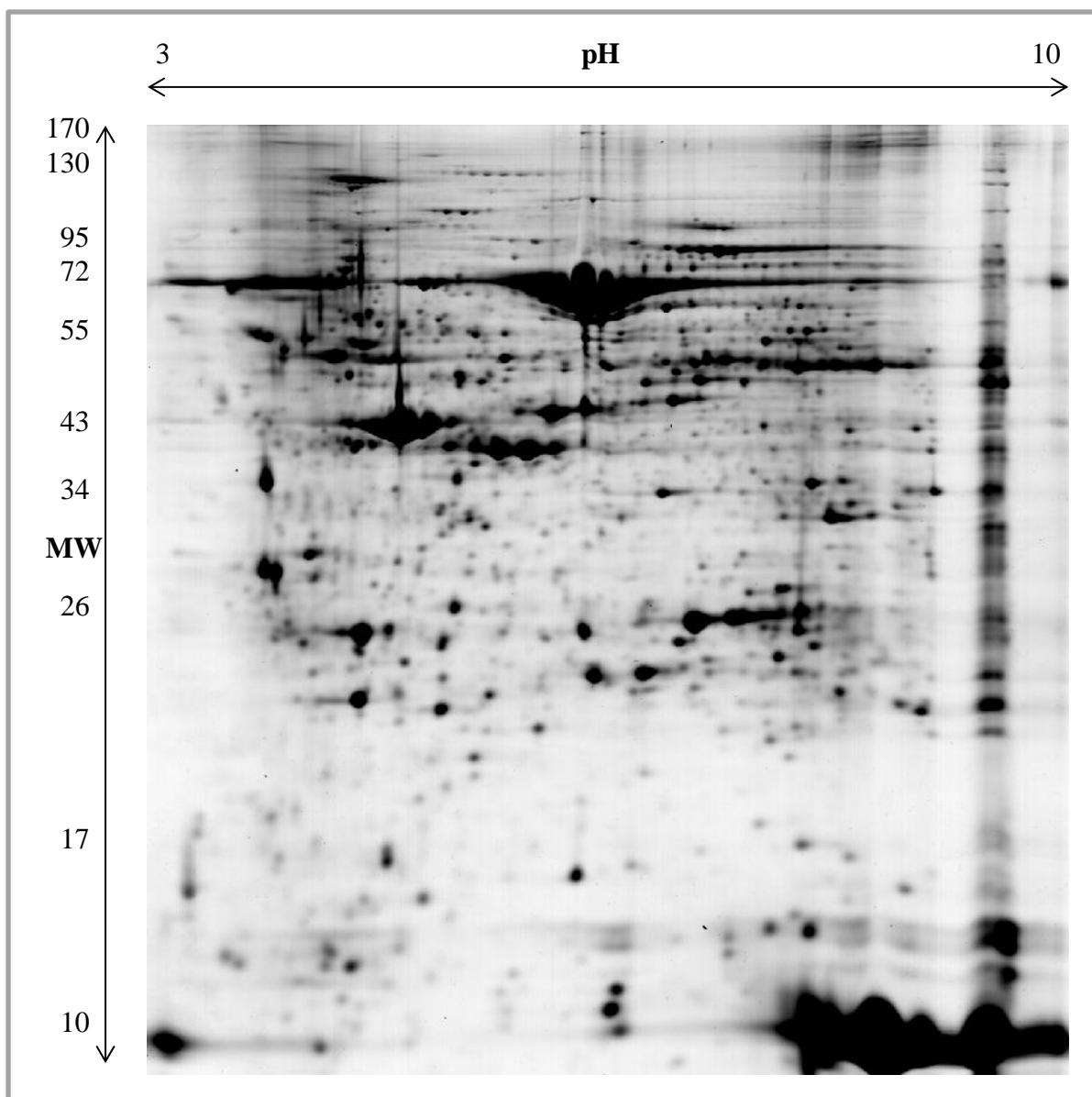


Abbildung 4.1 Zweidimensionales Gel
Erläuterungen siehe Text; MW: molecular weight (englisch: Molekulargewicht)[kDa]

5.3 Signifikant veränderte Proteinexpressionen

Nach softwaregestützter Auswertung zeigten 64 Spots signifikante ($p<0,05$) Expressionsunterschiede. Davon wurden 13 eindeutig und reproduzierbar massenspektrometrisch identifiziert. Es ergaben sich daraus neun in der manifesten Herzinsuffizienz differentiell exprimierte pulmonale Proteine. Hiervon waren fünf Proteine (neun Spots entsprechend) im Proteom der herzinsuffizienten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkt exprimiert, vier Proteine (und Spots) entsprechend vermindert. Die Tatsache, dass im Gel räumlich voneinander getrennte Spots auf ein und dasselbe Protein zurückzuführen sind, weist darauf hin, dass unterschiedliche Proteinmodifikationen differentiell exprimiert werden.

Die Tabelle 4.2. a und b zeigt eine übersichtliche Darstellung der in der manifesten Herzinsuffizienz differentiell exprimierten Spots und der massenspektrometrisch identifizierten zugehörigen Proteine des pulmonalen Proteoms.

	Proteinname	NCBI Account Nummer	Proteinscore	Spotintensitäten CHF/CTRL
1	Indolethylamine N-Methyltransferase	gi 126723078	102	1,6
2	Indolethylamine N-Methyltransferase	gi 126723078	123	nur in CHF exprimiert
3	Tyrosine 3-Monooxygenase/ Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	gi 148680891	296	1,6
4	Beta-Actin	gi 89257929	128	3,2
5	Beta-Actin	gi 89257929	428	2,1
6	Beta-Actin	gi 63055057	88	1,9
7	Actin, cytoplasmic 2-like isoform 1	gi 297702010	342	1,8
8	Serum albumin precursor	gi 126723746	232	1,9
9	Serum albumin precursor	gi 126723746	87	1,7

Tabelle 4.2a Pulmonales Proteom: In der manifesten Herzinsuffizienz signifikant ($p<0,05$) vermehrt exprimierte Spots in der 2D-Gelelektrophorese und massenspektrometrisch identifizierte Proteine

	Proteinname	NCBI Account Nummer	Proteinscore	Spotintensitäten CHF/CTRL
10	Transthyretin	gi 291394246	207	0,7
11	Biliverdin-Reductase B (flavin reductase (NADPH))-like	gi 291414104	268	0,8
12	Fibrinogen, gamma chain	gi 291401113	522	0,7
13	Mitochondriale ATP-Synthase, beta subunit	gi 291389459	885	0,8

Tabelle 4.2b Pulmonales Proteom: In der manifesten Herzinsuffizienz signifikant ($p<0,05$) vermindert exprimierte Spots in der 2D-Gelelektrophorese und massenspektrometrisch identifizierte Proteine

5.4 Validierung mit Western Blot

Die Validierung der Expressionsunterschiede pulmonaler Proteine mittels Western Blot wurde exemplarisch für zwei Proteine durchgeführt. Wie bereits bei der Methodenbeschreibung des Western Blots in Gliederungspunkt 2.7 erläutert, ist die Bestätigung der Ergebnisse, die aus der Untersuchung eines Proteoms mittels zweidimensionaler Elektrophorese und Massenspektrometrie gewonnen wurden, durch eine weitere unabhängige Methode wie Western Blot ein gängiges und etabliertes Verfahren [39].

Für die Proteine Tyrosine 3-Monooxygenase/ Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide, und Indolethylamine N-Methyltransferase konnte die in der 2D-Elektrophorese festgestellte vermehrte Expression in der CHF-Population im Vergleich zur CTRL-Gruppe im Western Blot bestätigt werden. Die entsprechenden Blots sind im Folgenden abgebildet. Diese differentielle Expression ist sowohl visuell auf den Blots erkennbar als auch in der Dichtemessung mit der Image-Processing-Software Image J nachweisbar, eine statistische Signifikanz konnte nicht gezeigt werden. Für beide Proteine betragen die Spotintensitätsunterschiede CHF/CTRL 1,6. Bei Tyrosine 3-Monooxygenase/ Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide, wurde in der zweidimensionalen Gelelektrophorese zusätzlich eine Isoform detektiert, die nur in der CHF-Gruppe auftrat. Auf das Vorliegen dieses Proteins in verschiedenen Isoformen, was im Abschnitt der Ergebnisdiskussion dieser Arbeit noch weiter erläutert wird, ist auch die Detektion weiterer Banden im Western Blot zurückzuführen, weil der im Western Blot verwendete Primärantikörper nicht spezifisch gegen die Epsilonisoform gerichtet ist, sondern gegen die Proteinfamilie, das YWHAE-Genprodukt.

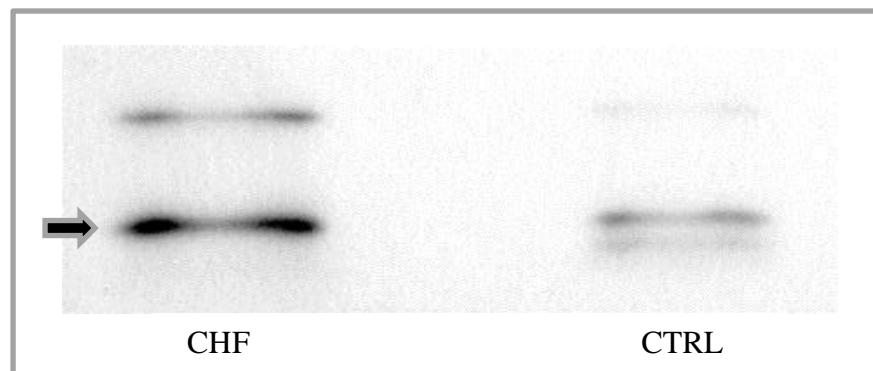


Abbildung 4.2a Validierung mit Western Blot für Tyrosine 3-Monoxygenase/
Tryptophan 5-Monoxygenase activation protein, epsilon polypeptide
Erläuterungen siehe Text

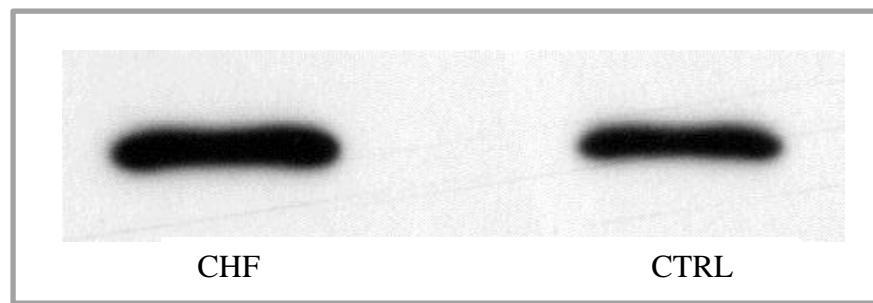


Abbildung 4.2b Validierung mit Western Blot für Indolethylamine N-
Methyltransferase
Erläuterungen siehe Text

6. Diskussion

6.1 Tachykardie-induzierte Herzinsuffizienz im Tiermodell

Die erfolgreiche Induktion der manifesten Herzinsuffizienz durch tachykardie Schrittmacherstimulation im beschriebenen Tiermodell mit Kaninchen wurde durch invasive hämodynamische Messungen von Herzfrequenz und Blutdruck sowie funktionelle und strukturelle Datenerhebungen in der Echokardiographie bewiesen. Insbesondere wurde so die signifikante linksventrikuläre Dilatation – durch Zunahme der Ventrikelgröße sowie Abnahme der muskulären Herzwanddicke – und die signifikante linksventrikuläre systolische Funktionseinschränkung – durch Reduktion der prozentualen systolischen Verkürzungsfraktion und Abfall des systolischen Blutdrucks – verifiziert. Hinsichtlich der in der Fragestellung dieser Arbeit interessierenden Lungenbeteiligung in der Herzinsuffizienz sei vermerkt, dass durch atriale Messungen diese ebenso nachgewiesen wurde. Als Hinweis auf erhöhte intraatriale Drücke und pulmonalvenöse Stauung dient die signifikante Zunahme des linksatrialen Durchmessers in der Echokardiographie und die als Gewichtszunahme quantifizierte signifikante links- und rechtsatriale Hypertrophie. In weiteren Tiermodellen zur Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz mit anderen Tierspezies und auch mit Kaninchen wurden bereits zuvor übereinstimmende Daten erhoben [24-26].

6.2 Pulmonale molekulare Veränderungen in der experimentellen manifesten Herzinsuffizienz

Die molekularen Veränderungen der Lunge in der experimentellen manifesten Herzinsuffizienz, die aus dieser Arbeit hervorgehen, sind die modifizierte Zusammensetzung des Zytoskeletts, die Beeinträchtigung der alveolokapillären Permeabilität, die Reduktion der enzymalen antioxidativen Fähigkeit, die beeinflusste zelluläre Energiegewinnung sowie die verstärkte Expression von Indolethylamine N-Methyltransferase.

6.2.1 Modifikation der Zusammensetzung des Zytoskeletts

Zwei der in der Herzinsuffizienz signifikant vermehrt exprimierten Proteine, die aus mehreren Spots identifiziert wurden, sind wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts: Beta-Actin und Gamma-Actin, auch cytoplasmic-1-Actin bzw. cytoplasmic-2-Actin genannt. Die wichtige Rolle von Actinen in der pulmonalen Reaktion auf eine Belastungssituation ist vorbeschrieben. Actine regulieren den Calciumeinstrom in die Zelle und dieser wird durch mechanischen Dehnungsreiz auf Lungengewebe aktiviert [27]. Im Herzinsuffizienzmodell im Speziellen ist eine Zunahme von Beta-Actin in pulmonalen Endothelzellen bekannt. So beschreiben Kerem A. u. a. massive Umbauvorgänge des endothelialen Zytoskeletts im Sinne der verstärkten Beta-Actin-Expression und der daraus folgenden gesteigerten Actinfilamentformation. Diese Modifikation der Zytarchitektur führt durch Störung der Regulation von endothelialer Signalwirkung und Funktion zur Beeinflussung der endothelialen Calciumhomöostase und zur endothelialen Dysfunktion der Lunge in der Herzinsuffizienz [28]. Auch Baranwal S. u. a. betonen die Bedeutung der zytoplasmatischen Beta- und Gamma-Actine zum Erhalt einer normalen Zytarchitektur und der epithelialen Barrierefunktion sowie Permeabilität. Diese beiden zytoskelettalen Proteine sind von besonderer Wichtigkeit in der Regulierung der Ausgeglichenheit und Integrität interzellulärer Verbindungen (tight junctions, adherens junctions) [29]. Hieraus kann – bildlich beschrieben – eine Brücke zur Erklärung des veränderten Austritts von Plasmaproteinen ins Lungengewebe durch Veränderung der alveolokapillären Permeabilität, wie im Folgenden erläutert, gebaut werden.

6.2.2 Veränderung der alveolokapillären Permeabilität

Aus der Beschreibung des vorangehenden Gliederungspunktes ergibt sich ein Erklärungsmodell für die differentielle Expression von Plasmaproteinen im Lungengewebe

in der Herzinsuffizienz. Primär kommt es zur modifizierten Zusammensetzung des Zytoskeletts und damit zur Störung interzellulärer Verbindungen. Dies führt zu veränderter epithelialer Permeabilität mit verändertem Austritt von Plasmaproteinen ins Lungengewebe. Da die beiden Spots, die auf das Hauptplasmaprotein Albumin zurückzuführen sind, in der Herzinsuffizienz in ihrer Intensität verstärkt sind, während die Spots der Plasmaproteine Fibrinogen und Transthyretin intensitätsvermindert sind, scheint diese Veränderung komplexer Art zu sein. Diese Ergebnisse zeigen also eine epitheliale Schrankenfunktionsstörung an, von der beschrieben ist, dass sie sowohl in der Entwicklung eines permeabilitätsbedingten als auch eines hydrostatischen Lungenödems, also auch des kardialen Lungenödems, eine Rolle spielt [30].

6.2.3 Reduktion der enzymalen antioxidativen Fähigkeit

Das Enzym Biliverdin Reductase katalysiert die Reduktion von Biliverdin zu Bilirubin. Neben seiner durchweg bekannten Eigenschaft als Pigment, das zu Ikterus führt, wenn es im Überschuss vorhanden ist, hat Bilirubin auch eine bedeutende physiologische Aufgabe, die 2002 von Baranano D. u. a. beschrieben wurde. Es ist ein starkes Antioxidans, das Zellen vor dem 10 000fachen Übermaß an H_2O_2 schützt. Bei dieser antioxidativen Wirkung wird Bilirubin selbst zu Biliverdin oxidiert, um dann durch die Biliverdin Reductase wieder zurückverwandelt zu werden, so dass sich das Bild eines Zyklus von Redoxreaktionen ergibt. Bei verminderter Expression dieses Enzyms wird dieser Zyklus gestört, indem weniger Bilirubin gebildet wird und dieses somit auch weniger Zellschutz durch seine verminderte antioxidative Wirkung ausübt. Es resultiert eine Vermehrung reaktiver Sauerstoffspezies, die die Apoptose von Zellen verursachen. Die Bedeutung von Bilirubin als wesentlicher antioxidativ wirkender Zellschutz wird im Vergleich mit der Wirkung von Glutathion nochmals verdeutlicht. Letzteres ist gemeinhin als physiologischer antioxidativ wirkender Zellschutz bekannt, doch seine Verminderung zeigt deutlich weniger Auswirkungen auf reaktive Sauerstoffspezies und zelluläre Apoptose [31]. Gerade in der Lunge ist aufgrund ihrer Exposition gegenüber Sauerstoff eine intakte und starke Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies essentiell. Ein Ungleichgewicht der oxidativen und antioxidativen Wirkungen, wie sie durch die Reduktion antioxidativer Enzyme hervorgerufen werden kann, kann zu einer Vielzahl von Atemwegserkrankungen führen. Gerade in der Pathogenese der Lungenfibrose ist dieses Missverhältnis als wesentlicher ursächlicher profibrotisch wirkender Faktor bewiesen, so dass die Anwendung von Antioxidantien als potentielle neue Therapiemaßnahme bei Lungenfibrose getestet wurde [32]. Im Umkehrschluss kann die Beeinflussung der pulmonalen

antioxidativen Fähigkeit als Auslöser für die fibrotischen Umbauvorgänge in der Lunge, wie sie in der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz auftreten, bedacht werden.

6.2.4 Beeinflussung der zellulären Energiegewinnung

Die Hauptaufgabe von Mitochondrien – Organellen, die in allen eukaryontischen Organismen vorkommen – ist die Energiesynthese in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung. Der abschließende Schritt dieses Syntheseweges wird durch ein Enzym der inneren mitochondrialen Membran, der mitochondrialen ATP-Synthase, katalysiert. Diese wurde in dieser Arbeit im Lungengewebe herzinsuffizienter Tiere signifikant vermindert exprimiert gefunden. Vermutlich spielt die verminderte Aktivität dieses Enzyms in vielen häufigen Krankheitsbildern eine – vielleicht sogar ursächliche – Rolle, wobei der Defekt der ATP-Synthase im klinischen Alltag nicht diagnostiziert wird. Von Bedeutung sind dabei nicht nur die verminderte Verfügbarkeit von Energie auf zellulärer Ebene, sondern auch sekundäre Effekte wie der vermehrte Anfall reaktiver Sauerstoffspezies und weiterer zum Teil unbekannter Funktionsstörungen, die zur Pathogenese dieser Erkrankungen beitragen [33]. Erst kürzlich betonten Schumacker u. a. die zentrale Bedeutung der Mitochondrien in der Überwachung der Sauerstoffradikalbildung, wodurch hier – um im Bilde zu bleiben – wiederum eine Brücke zur bereits oben beschriebenen reduzierten antioxidativen Fähigkeit der Lunge in der Herzinsuffizienz gebaut werden kann. Mitochondrien sind also nicht nur die Kraftwerke der Zelle, deren Produktionskraft in der Herzinsuffizienz eingeschränkt ist, sondern auch die Wächter der pulmonalen Zellen bei ihrer Antwort auf Exposition gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies. Sind also, wie in dieser Arbeit gezeigt, mitochondriale Metabolismuswege gestört, kommt es unter Anderem durch Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies zur Krankheitsentwicklung in der Lunge [34]. Zu pulmonalen Pathologien in der Herzinsuffizienz, wie der Lungenfibrose, führen somit nicht nur die reduzierte zelluläre antioxidative Enzymaktivität, sondern auch gestörte mitochondriale Prozesse.

14-3-3-Proteine bilden eine Proteinfamilie, die aus sieben Isoformen besteht und durch Bindung an phosphorylierte Proteinsequenzen vielfältige Zellfunktionen reguliert. Diese Proteine sind an Zellmetabolismus, Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle, Apoptose, Proteintransport, Transkription und Antwort auf Stress sowie auch maligner Transformation beteiligt. Erstmals wurde jetzt eine neue Funktion der Isoformen ζ , γ , ϵ und τ identifiziert – die ATPase-Aktivität, die Hydrolyse von ATP [35]. Das 14-3-3-

Protein Epsilon ist im Lungengewebe bei experimenteller Herzinsuffizienz signifikant verstkt nachweisbar. Gängige synonym verwendete Bezeichnungen sind auch Tyrosine 3-Monooxygenase/ Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide, sowie YWHAE-Genprodukt.

Im Lungengewebe herzinsuffizienter Tiere sind also zwei Proteine mit gegensätzlicher Funktion im Hinblick auf ATP in entgegengesetzter Weise quantitativ verändert. Die mitochondriale ATP-Synthase wird vermindert, das Tyrosine-3-Monooxygenase/ Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide, mit ATPase-Aktivität vermehrt exprimiert.

6.2.5 Verstktete Expression von Indolethylamine N-Methyltransferase

Aus zwei Spots im zweidimensionalen Abbild des pulmonalen Proteoms wurde das Protein Indolethylamine N-Methyltransferase identifiziert. Einer davon ist in der CHF-Population verstkt im Vergleich zur Kontrollgruppe exprimiert, der andere tritt nur in der erstgenannten auf. Es ist von einer Isoform auszugehen, die nur in der Herzinsuffizienz im Lungenproteom erscheint und die nach den entsprechenden Laufstrecken in der zweidimensionalen Gelelektrophorese durch ähnliches Molekulargewicht und unterschiedlichen isoelektrischen Punkt charakterisiert ist.

Indolethylamine N-Methyltransferase katalysiert die N-Methylierung von Tryptamine und strukturell verwandten endogenen und exogenen Molekülen und wird durch die Produkte dieser Reaktion, wie S-Adenosyl-L-Homocystein und N,N-Dimethyltryptamine, inhibiert. Untersuchungen – v.a. mit Kaninchenlungen – wurden durchgefürt, weil über die Bildung von psychoaktiven Molekülen oder Neurotoxinen bei dieser Reaktion und ihre daraus folgende klinische Relevanz spekuliert wurde. Die INMT aus Kaninchenlungen scheint einer Familie von kleinmolekularen, im Zytosol vorkommenden Methyltransferasen anzugehören. Die Bedeutung der durch die Indolethylamine N-Methyltransferase katalysierten Methylierungsreaktion *in vivo* ist nicht genau bekannt und wird hier – auch im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz – zukftigen Experimenten überlassen [36, 37].

7. Zusammenfassung und Ausblick

Wie bereits zuvor beschrieben, lag das Potential dieser Studie in der Aufdeckung fundamentaler molekularer Veränderungen, um neue Hypothesen zu schaffen. Die Einbettung der gesichert veränderten Proteinexpressionsmuster in einen molekularen Zusammenhang und ihre funktionelle Relevanz bleiben zukünftigen Studien vorbehalten. Ein weiterer vorstellbarer Forschungsansatz ist die Detektion der Lokalisation der differentiell exprimierten Proteine auf zellulärer Ebene.

Fundament der vorliegenden Arbeit war ein von exogenen Störfaktoren kaum beeinflusstes Tiermodell, in welchem die Induktion der zu untersuchenden manifesten Herzinsuffizienz durch tachykarde Schrittmacherstimulation durchgeführt wurde. Deren Erfolg wurde durch hämodynamische Messungen sowie funktionelle und strukturelle Datenerhebungen objektiviert. Durch die klassische proteomische Untersuchungsmethode der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten fundamentale molekulare Veränderungen der Lunge in der experimentellen manifesten Herzinsuffizienz detektiert werden. Es wurde die Veränderung der alveolokapillären Permeabilität nachgewiesen, ebenso wie ihre pathogenetische Grundlage – die modifizierte Zusammensetzung des Zytoskeletts, deren klinische Bedeutung die Entwicklung eines Lungenödems darstellt. Gezeigt wurde weiterhin eine Reduktion der enzymalen antioxidativen Fähigkeit des Lungengewebes, die durch Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies die Pathogenese der Lungenfibrose als Folgekomplikation der Herzinsuffizienz fördert und somit ebenso von nicht unwesentlicher klinischer Relevanz ist. Hervorzuheben ist auch die Beeinflussung der zellulären Energiegewinnung, die zur Verminderung zellulär vorliegender energiereicher Produkte führt und zum Teil auch für den Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich zu zeichnen ist. Ferner wurde die verstärkte Expression von Indolethylamine N-Methyltransferase nachgewiesen, wobei die Darstellung deren funktioneller Bedeutung zukünftigen Experimenten vorbehalten bleibt.

Diese Arbeit schöpft ihr Potential der Darstellung neuer Ansatzpunkte für frühe therapeutische Interventionen aus. Die Berechtigung der weiteren Erforschung der Herzinsuffizienz mit der Verifizierung der beschriebenen Hypothesen durch zukünftige Experimente liegt in der Ausweitung des Verständnisses dieser komplexen Erkrankung und Entwicklung therapeutischer Ansätze – besonders auch im Hinblick auf prognostizierte epidemiologische Veränderungen im Sinne der zunehmenden klinischen Relevanz in den nächsten Jahrzehnten.

8. Literaturverzeichnis

- 1 McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad A, Zeiher A: ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012, European Journal of Heart Failure 2012, 14, S. 803–869.
- 2 Mosterd A, Hoes AW: Clinical Epidemiology of Heart Failure, Heart 2007, 93, S. 1137–1146.
- 3 Guha K, McDonagh T: Heart Failure Epidemiology: European Perspective, Current Cardiology Reviews 2013, 9, S. 123-127.
- 4 Monnet X, Teboul JL, Richard C: Cardiopulmonary interactions in patients with heart failure, Current Opinion in Critical Care 2007, 13, S. 6–11.
- 5 Costello ML, Mathieu-Costello O, West JB: Stress failure of alveolar epithelial cells studied by scanning electron microscopy, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1992, 145(6), S. 1446-1455.
- 6 Tsukimoto K, Mathieu-Costello O, Prediletto R, Elliott AR, West JB: Ultrastructural appearances of pulmonary capillaries at high transmural pressures, Journal of Applied Physiology 1991, 71, S. 573-582.
- 7 West JB: Invited review: pulmonary capillary stress failure, Journal of Applied Physiology 2000, 89, S. 2483-2489.
- 8 Guazzi M: Alveolar-Capillary Membrane Dysfunction in Heart Failure: Evidence of a Pathophysiologic Role, Chest 2003, 124, S. 1090 –1102.
- 9 Guazzi M: Alveolar Gas Diffusion Abnormalities in Heart Failure, Journal of Cardiac Failure 2008, 14, S. 695-702.
- 10 Kingsbury MP, Huang W, Donnelly JL, Jackson E, Needham E, Turner MA, Sheridan DJ: Structural remodelling of lungs in chronic heart failure, Basic Research in Cardiology 2003, 98, S. 295-303.
- 11 Birner C, Dietl A, Deutzmann R, Schröder J, Schmid P, Jungbauer C, Resch M, Endemann D, Stark K, Rieger G, Luchner A: Proteomic Profiling implies mitochondrial dysfunction in tachycardia-induced heart failure, Journal of Cardiac Failure 2012, 18, S. 660-673.
- 12 Birner C, Husser O, Jeron A, Rihm M, Fredersdorf S, Resch M, Schmid P, Endemann D, Rieger G, Luchner A: Differential expression of potassium channels und abnormal

- conduction in experimental tachycardia-induced heart failure, Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology 2012, 385, S. 473-480.
- 13 Birner C, Ulucan C, Bratfisch M, Götz T, Dietl A, Schweda F, Riegger GA, Luchner A: Antihypertrophic effects of combined inhibition of the renin-angiotensin system (RAS) and neutral endopeptidase (NEP) in progressive, tachycardia-induced experimental heart failure, Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology 2012, 385, S. 1117-1125.
- 14 Birner C, Ulucan C, Fredersdorf S, Rihm M, Löwel H, Stritzke J, Schunkert H, Hengstenberg C, Holmer S, Riegger G, Luchner A: Head-to-head comparison of BNP and IL-6 as markers of clinical and experimental heart-failure: Superiority of BNP, Cytokine 2007, 40, S. 89-97.
- 15 Kamaruzaman NA, Kardia E, Kamaldin NA, Latahir AZ, Yahaya BH: The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy, BioMed Research International 2013, ID 691830.
- 16 Görg A, Klaus A, Lück C, Weiland F, Weiss W: Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis, A Laboratory Manual, München, 2007.
- 17 Michov B: Elektrophorese, Theorie und Praxis, Berlin, 1995, S. 245-248.
- 18 Neuhoff V, Stamm R, Eibl H: Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis, Electrophoresis 1985, 6, S. 427-448.
- 19 James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G: Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting, Biochemical and Biophysical Research Communications 1993, 195, 1, S. 58-64.
- 20 Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ: Rapid identification of protein by peptide-mass fingerprinting, Current Biology 1993, 3, S. 327-332.
- 21 Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76, 9, S. 4350-4354.
- 22 Taylor SC, Posch A: The Design of a Quantitative Western Blot Experiment, BioMed Research International 2014, ID 361590.
- 23 Mahmood T, Yang PC: Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, North American Journal of Medical Sciences, September 2012, 4(9), S. 429-434.

- 24 Elsner D, Riegger GAJ: Experimental Heart Failure Produced by Rapid Ventricular Pacing in the Dog, *Journal of Cardiac Failure* 1995, 1, 3, S. 229-247.
- 25 Luchner A, Borgeson DD, Grantham JA, Friedrich E, Riegger GAJ, Burnett JC Jr, Redfield MM: Relationship between left ventricular wall stress and ANP gene expression during the evolution of rapid ventricular pacing-induced heart failure in the dog, *European Journal of Heart Failure* 2 2000, S. 379-386.
- 26 Luchner A, Muders F, Dietl O, Friedrich E, Blumberg F, Protter AA, Riegger GAJ, Elsner D: Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction, *Cardiovascular Research* 51 2001, S. 601-607.
- 27 Ito S, Suki B, Kume H, Numaguchi Y, Ishii M, Iwaki M, Kondo M, Naruse K, Hasegawa Y, Sokabe M: Actin cytoskeleton regulates stretch-activated Ca²⁺ influx in human pulmonary microvascular endothelial cells, *American Journal of respiratory cell and molecular biology* 2010, 43, S. 26-34.
- 28 Kerem A, Yin J, Kaestle SM, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, Kuebler WM: Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization, *Circulation Research* 2010, 106, S. 1103-1116.
- 29 Baranwal S, Naydenov NG, Harris G, Dugina V, Morgan KG, Chaponnier C, Ivanov AI: Nonredundant roles of cytoplasmic β - and γ -Actin isoforms in regulation of epithelial apical junctions, *Molecular Biology of the Cell* 2012, 23, S. 3542-3553.
- 30 Bachofen H, Schürch S, Weibel ER: Experimental hydrostatic pulmonary edema in rabbit lungs: Barrier lesions, *The American review of respiratory disease* 1993, 147 (4), S. 997-1004.
- 31 Baranano D, Rao M, Ferris CD, Snyder SH: Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, 99 (25), S. 16093-16098.
- 32 Day B: Antioxidants as Potential Therapeutics for Lung Fibrosis, *Antioxidants & redox signaling* 2008, 10 (2), S. 355-370.
- 33 Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M, Caubet SD, di Rago JD: Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches, *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, 1793, S. 186-199.
- 34 Schumacker T, Gillespie MN, Nakahira K, Choi AMK, Crouser ED, Piantadosi CA, Bhattacharya J: Mitochondria in lung biology and pathology: more than just a

- powerhouse, American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology 2014, 306, S. 962-974.
- 35 Ramteke M, Shelke P, Ramamoorthy V, Somavarapu AK, Gautam AKS, Nanaware PP, Karanam S, Mukhopadhyay S, Venkatraman P: Identification of a novel ATPase activity in 14-3-3 proteins – Evidence from enzyme kinetics, structure guided modeling and mutagenesis studies, FEBS Letters 2014, 588, S. 71-78.
- 36 Irace G, Colonna G, Camardella M, Pietra GD, Porta R: Purification and Molecular Properties of Rabbit Lung Indolamine N-Methyltransferase, Biochemistry 1982, 21, S. 1464- 1470.
- 37 Thompson MA, Weinshilboum RM: Rabbit Lung Indolethylamine N-Methyltransferase: cDNA and gene cloning and characterization, The Journal of Biological Chemistry 1998, 273 (51), S. 34502-34510.

Auszüge dieser Dissertation wurden in Coautorenschaft publiziert:

Birner C., **Hierl S.**, Dietl A., Hupf J., Jungbauer C., Schmid P.M., Rümmele P., Deutzmann R., Rieger G., Luchner A.: Experimental Heart Failure Induces Alterations of the Lung Proteome – Insight into Molecular Mechanisms, Cellular Physiology and Biochemistry 2014, 33, S. 692-704.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
APS	Ammoniumpersulfat/ Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CBB	Coomassie Blaufärbung
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl ammonio]-1-propane sulphonate
CHF	<i>englisch:</i> congestive heart failure (manifeste Herzinsuffizienz)
CTRL	Kontrolle
DTT	Dithiothreitol
FS	<i>englisch:</i> fractional shortening (prozentuale systolische Verkürzungsfraktion)
HF	Herzfrequenz
IEF	Isoelektrische Fokussierung
INMT	Indolethylamine N-Methyltransferase
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IVSd	interventrikuläre diastolische Septumwanddicke
IVSs	interventrikuläre systolische Septumwanddicke
KG	Körpergewicht
LA	linkes Atrium
LV	linker Ventrikel
LVIDd	linksventrikulärer enddiastolischer Innendurchmesser
LVIDs	linksventrikulärer endsystolischer Innendurchmesser
LVPWd	linksventrikuläre diastolische Hinterwanddicke
LVPWs	linksventrikuläre systolische Hinterwanddicke
MALDI	<i>englisch:</i> Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Massenspektrometrie
NL	nicht linear
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
pI	isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rechtes Atrium
rpm	<i>englisch:</i> rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RR	Blutdruck
RV	rechter Ventrikel
SDS	<i>englisch:</i> Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TOF	Time-of-flight-Analysator
TTBS	<i>englisch:</i> Tris-Buffered Saline and Tween 20
YWHAE	Kodierendes Gen für Tyrosine 3-Monooxygenase/ Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide, Synonym: 14-3-3-Protein Epsilon

9.2 Danksagung

Herrn Professor Dr. Günter Rieger, dem ehemaligen Direktor, sowie Herrn Professor Dr. Lars Maier, seinem Nachfolger, danke ich für die Möglichkeit der Promotion in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Klinikums der Universität Regensburg.

Zudem gebührt mein Dank Herrn Professor Dr. Andreas Luchner für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die stete Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christoph Birner. Seine Wissensvermittlung, seine kontinuierliche, engagierte, gewissenhafte und kompetente Betreuung des Werdegangs meiner Arbeit und seine motivierenden und konstruktiven Ratschläge trugen maßgeblich zum erfolgreichen Ausgang meiner Dissertation bei.

Der gesamten Forschungsgruppe Experimentelle Herzinsuffizienz der Medizinischen Klinik II danke ich für die Vermittlung technischen Wissens und die Unterstützung des Entstehungsprozesses dieser Arbeit. Herrn Professor Dr. Rainer Deutzmann und Herrn Eduard Hochmuth vom Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg gebührt mein Dank für die Durchführung der Massenspektrometrie und die fachliche Beratung.

In Liebe und Dankbarkeit widme ich diese Arbeit meinen Eltern, Irene und Bernd Hierl. Ihre bedingungslose Liebe und grenzenlose Unterstützung trug mich vom Beginn des experimentellen Tuns bis zur Verfassung dieses Schriftstücks. Große Dankbarkeit schulde ich auch meiner Schwester, Dr. Julia Hierl.

9.3 Erklärung zum Promotionsverfahren gemäß Promotionsordnung

ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: Hierl
Vorname: Sarah
geb. am: 21. Oktober 1988
in: Weiden i. d. OPf.

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen Doktorgrades** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische Doktorprüfung** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.
Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Die einmalige Rücknahme des Promotionsgesuches ist bis zur Bestellung der Gutachter zulässig.