

Aus der Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie  
des Universitären Herzzentrums Hamburg gGmbH  
Direktor: Prof. Dr. med. T. Meinertz

# **Die Suche nach Schlüsselproteinen der Arteriogenese bei Ratten mit Hilfe der komparativen Proteomanalyse**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Björn Kitzing

aus Bremen

Hamburg 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

gewidmet meinen lieben Eltern

To the physician particularly a scientific discipline is an incalculable gift, which leavens his whole life, giving exactness to habits of thought and tempering the mind with that judicious faculty of distrust, which can alone, amid the uncertainty of practice, make him wise.

Sir William Osler ( 1849 – 1919 )

## **INHALTSVERZEICHNIS:**

<u>Fragestellung</u> .....	5
<u>Einleitung</u> .....	6
1.1 Vaskulogenese .....	6
1.2 Angiogenese .....	7
1.3 Arteriogenese .....	8
1.4 Klinische Anwendung in der Kardiologie und Angiologie .....	9
1.5 Proteomics .....	10
<u>Material und Methoden</u> .....	12
2.1 Operationen .....	12
2.2 Materialgewinnung .....	14
2.3 Dismembrator .....	15
2.4 Sequentielle Proteinextraktion .....	16
2.5 2 D-Gelelektrophorese .....	17
2.5.1 Isoelektrische Fokussierung ( 1.Dimension ) .....	17
2.5.2 SDS-PAGE ( 2.Dimension ) .....	19
2.6 Proteinfärbung und -darstellung .....	21
2.7 Computer-unterstützte Proteindetektion und -quantifizierung .....	22
2.8 Massenspektroskopie und Sequenzierung .....	24
2.9 Westernblot .....	25
2.10 Bioinformatik .....	26
<u>Ergebnisse</u> .....	28
3.1 Gele und Spotmuster .....	28
3.2 Tropomyosin .....	32
3.3 Albumin .....	33
<u>Diskussion</u> .....	34
4.1 Biphasischer Verlauf der Arteriogenese .....	34
4.2 Initiation des Kollateralarterienwachstums .....	35
4.3 Mechanotransduktion .....	38
4.4 Interpretation der Ergebnisse .....	39
4.5 Problematik der Probenaufbereitung .....	40
4.6 Die Rolle der Proteomanalyse .....	41
<u>Zusammenfassung</u> .....	42
<u>Abkürzungsverzeichnis</u> .....	43
<u>Literaturverzeichnis</u> .....	44
<u>Danksagung</u> .....	47
<u>Lebenslauf</u> .....	48
<u>Erklärung</u> .....	49

## **FRAGESTELLUNG:**

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist die Anwendung der komparativen Proteomanalyse in der Erforschung des Kollateralarterienwachstums. Dabei sollte herausgefunden werden, inwieweit proteinbiochemische Methoden herangezogen werden können, um an einem etablierten Rattenmodell, die Regulation von Gefäßproteinen während des Wachstums der Kollateralarterien zu untersuchen.

## **EINLEITUNG:**

### **1.1 Vaskulogenese**

Das kardiovaskuläre System erreicht embryonal als erstes Organ die volle Funktion.

Zwei Vorgänge bestimmen seine Entwicklung, sie werden als Vaskulogenese und

Angiogenese bezeichnet. Die ersten embryonalen Blutgefäße entstehen durch

Vaskulogenese: mesodermale Zellformationen - die Angioblasten – differenzieren sich in situ zu Endothelzellen und bilden Kapillaren. Auf diese Weise entstehen große

Gefäßorgane wie Herz und Aorta. Vorgänge dieser Vaskulogenese laufen nur während der frühen Embryogenese ab, sie kommen vermutlich bei Erwachsenen nicht vor (1).

## 1.2 Angiogenese

Angiogenese bedeutet Bildung von Kapillaren ausgehend von bereits bestehenden Gefäßen, also von Kapillaren und postkapillaren Venolen durch Sprossung oder ohne Sprossung durch intravasale Teilung ( Intussuszeption ). Sie ist ein wichtiger Bestandteil von vielen physiologischen und pathologischen Vorgängen wie Wund- und Frakturheilung, Follikulogenese, Ovulation and Schwangerschaft. Normalerweise sind diese Vorgänge von relativ kurzer Dauer und unterliegen einer stringenten Regulation. Fehlt diese jedoch stellt die Angiogenese einen signifikanten pathogenetischen Faktor dar, der entscheidenden Anteil hat an Tumorwachstum, Metastasenbildung, rheumatoide Arthritis und Retinopathien (2-4).



### **1.3 Arteriogenese**

Arteriogenese dagegen ist das Wachstum von Kollateralarterien aus präexistierenden arteriolen Verbindungen. Diese Gefäße werden nach der Terminologie von Longland et al. (5) in drei Abschnitte unterteilt: Stem Zone, Midzone und Re-entry Zone.

Aufgrund der Tatsache, dass die Stem und Re-entry Zone der präexistierenden Arteriolen fixiert sind, führt die zelluläre Hyperplasie und Hypertrophie der Gefäße zu einer spiralförmigen bzw. korkenzieherartigen Form dieser Kollateralarterien (1).

## 1.4 Klinische Anwendung in der Kardiologie und Angiologie

Die Morbidität und Mortalität der koronaren Herzerkrankung konnten in den letzten 30 Jahren durch revaskularisierende Verfahren wie Thrombolysetherapie, Ballondilatation und Bypass-Operation entscheidend gesenkt werden. Die Anwendung der Ballondilatation ist jedoch beschränkt auf Gefäße, die mit dem Führungsdraht erreicht werden können. Darüber hinaus ist ein weiterer Nachteil dieser Methode die trotz Einführung der Stentimplantation immer noch hohe Restenoserate, die zwischen 6 und 30 Prozent liegt, abhängig von der Art der dilatierten Läsion. Die Notwendigkeit einer zufriedenstellenden linksventrikulären Funktion, das Vorhandensein anschlussfähiger Gefäße sowie die beschränkte Haltbarkeit venöser Grafts auf der einen Seite und die geringe Anzahl verwendbarer arterieller Grafts auf der anderen Seite limitieren dagegen den Erfolg von Bypassoperationen. Aus diesen Gründen scheint es nur konsequent, die Möglichkeit einer „biologischen“ Revaskularisation durch das Wachstum alternativer Gefäßverbindungen näher zu erforschen, um die Entwicklung der therapeutischen Arteriogenese voranzutreiben.

## 1.5 Proteomics

Ein Proteom ist die quantitative Darstellung des gesamten Proteinexpressionsmusters einer Zelle, eines Organismus oder einer Körperflüssigkeit unter genau definierten Bedingungen. Die Erforschung dieser Muster mit speziellen Methoden nennt man Proteomics.

Mit Hilfe der Proteomanalyse ist die direkte Messung der Proteine in Bezug auf ihr Vorhandensein und ihre relative Menge möglich (6). Dabei ist das übergeordnete Ziel einer Proteomanalyse die Charakterisierung des komplexen Netzwerkes der Zellregulation. Denn weder der genomische DNA Code eines Organismus noch die Menge an mRNA, die für jedes Genprodukt (Protein) synthetisiert wird, spiegelt akkurat den Zustand einer lebende Zelle wider (7), der sich durch Interaktion mit der Umwelt ständig verändern kann. Will man somit bestimmen, welche Proteine wie stark exprimiert wurden und ob posttranslationale Modifikationen aufgetreten sind, so benötigt man die Proteomanalyse. Zwei oder mehrere Zustände einer Zelle oder eines Organismus (z.B. gesundes und krankes Gewebe) können verglichen werden, um dann spezifische qualitative und quantitative Veränderungen der Proteine zu identifizieren.

Eine der größten Herausforderungen der Proteomanalyse ist die reproduzierbare Fraktionierung dieser komplexen Proteingemische unter Beibehaltung der qualitativen und quantitativen Verhältnisse. Zur Zeit ist die zwei-dimensionale Polyacrylamide Gelelektrophorese (2-D PAGE) die einzige Methode, die diese Aufgabe bewältigen kann und hat demzufolge eine signifikante Bedeutung erlangt (8, 9). Aufgrund der Tatsache, dass 2-D PAGE in der Lage ist über 1,800 Proteine in einem einzelnen Gel aufzutrennen (10), ist es die Methode der Wahl der Proteomforschung, wo multiple Proteine für eine parallele Analyse getrennt werden müssen. Sie erlaubt es Hunderte

bis Tausende von Genprodukten gleichzeitig zu analysieren. In Kombination mit computer-unterstützten Image Evaluationssystemen für qualitative und quantitative Proteomuntersuchungen ermöglicht es diese Methode, die Daten mehrerer Forschungsgruppen zu katalogisieren und zu vergleichen.

## **MATERIAL UND METHODEN:**

### **2.1 Operationen**

Alle Operationen wurden im Einklang mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt ( Tierversuchsgenehmigung der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Freien und Hansestadt Hamburg 12/01 ).

Das verwendete Tiermodell ist bereits etabliert und beruht auf der Induktion des Kollateralarterienwachstums im Oberschenkel von Ratten durch Ligatur der Arteria femoralis. Die folgenden vier Argumente sprechen für dieses Tiermodell:

- die Kollateralarterien der unteren Extremitäten weisen eine hohe Kompensationspotenz auf
- nach Ligatur der Arteria femoralis kommt es zu keinem Ausfall von Vitalfunktionen
- die Frühphasen der Arteriogenese lassen sich gut studieren
- die Operation stellt nur einen minimalinvasiven Eingriff dar

Es wurden 5 CD-Ratten mit einem Gewicht von ca. 300g ausgewählt, bei denen eine Ligatur der Arteria femoralis durchgeführt werden sollte. Dabei wurde eine Ethernarkose mit nachfolgender intraperitonealer Injektion von 0,5 ml Ketamin, 0,15 ml Rompun und 0,2 ml Heparin angewandt. Nach erfolgreichem Einsetzen der Narkose, wurde an der rechten Oberschenkelinnenseite der Ratte eine ca. 3 cm lange Hautinzision gesetzt und daraufhin die Arteria femoralis teilweise freipräpariert. Dabei hat es sich als sinnvoll erwiesen, eine oberflächliche Vene abzubinden und zu durchtrennen, um somit einen besseren Zugang zu dem Gefäß-Nerven-Bündel zu erlangen. Nach Auffinden und vorsichtiger Trennung von der Vena femoralis sowie von dem Nervus femoralis, erfolgte eine zweifache Ligatur der Arterie im Abstand von ca. einem Zentimeter.

Danach wurde die Haut wieder zusammengenäht und die operierte Ratte bekam zur postoperativen Schmerzstillung einige Tropfen Novalgin in das Trinkwasser.

## 2.2 Materialgewinnung

Nach exakt 48 Stunden, also zum Zeitpunkt der maximalen Proliferation der Kollateralarterien (11), wurde die jeweilige Ratte ein zweites Mal operiert. Wieder erfolgte die Narkoseeinleitung wie oben beschrieben. Nach Setzen eines lateralen Hautschnitts longitudinal entlang des Bauches und Durchtrennung der Bauchmuskulatur erfolgte die Freipräparierung der Aorta abdominalis. Nach proximalem Abbinden und Inzision wurde Heparin intraarteriell über die Aorta injiziert, um der Bildung von Thromben vorzubeugen. Daraufhin erfolgte die Kanülierung der Aorta und durch Durchtrennung der Vena cava inferior sowie durch intrakardialer Injektion von Kaliumchlorid wurde die Ratte getötet. Nun erfolgte die Applikation von warmem Wasser über die Kanüle, um die Gefäße zu erweitern und das Blut rauszuspülen. Danach konnte das gelatine- und bariumsulfathaltige Kontrastmittel ebenfalls über die Kanüle appliziert werden. Um das Kontrastmittel erstarren zu lassen, wurde die Ratte in einen mit Eis gefüllten Styroporbehälter gelegt. Nach ca. 20 Minuten wurde dann von der Kniekehle ausgehend eine ca. 2,5 cm lange Kollateralarterie auf der rechten Seite freipräpariert. Auf der linken Seite wurde das entsprechende Kontrollgefäß entnommen. Direkt nach Entnahme wurden die Kollateralarterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in ebenfalls gefrorenen Plastiktubes gelegt, um dann bei minus 80 Grad Celsius gelagert zu werden.

### 2.3 Dismembrator

Nach Abwiegen der Kollateral- und Kontrollgefäße, erfolgt die Pulverisierung mit Hilfe eines Bio-Rad Dismembrators. Dabei wird der Stahlbehälter, in dem die Zertrümmerung vonstatten geht, einige Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und danach mit dem abgewogenen Gefäß sowie einer Zertrümmerungskugel beladen. Nach Einspannen des Behälters in den Dismembrator werden die Zertrümmerungszeit ( 60 Sekunden ) und die Frequenz ( 1600 rpm ) eingegeben und das Gerät gestartet. Mit einem ebenfalls vorgekühlten kleinen Löffel werden dann die pulverisierten Gefäßreste in einen mit Tris-Puffer gefüllten Eppendorfcup gekratzt. Um die Lösung des Gefäßmaterials zu verbessern, werden die Cups durch den Whirler einige Sekunden durchgeschüttelt. Anschließend werden die Zellen der Gefäße mit Hilfe einer Ultraschallsonde zum Platzen gebracht, so dass die zytosolischen Proteine freigesetzt werden. Danach werden die Cups 5 Minuten stehen gelassen, damit sich das Bariumsulfat (Kontrastmittel ) absetzen kann. Der Überstand mit den Zellfragmenten und Proteinen wird abpipettiert und in ein anderes Cup gefüllt.



## 2.4 Sequentielle Proteinextraktion

Um die Komplexität der Proben zu reduzieren, wird nun eine sequentielle Proteinextraktion durchgeführt. Dabei benutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der Proteine, um eine dritte Dimension in der Proteinseparation zu erreichen. Hierzu wurde das ReadyPrep Sequential Extraction Kit der Firma Bio-Rad mit dazugehörigem Protokoll verwendet. Die Proteine werden sequentiell extrahiert, indem nacheinander mit 3 verschiedenen Lösungen mit steigender Lösbarkeit zentrifugiert wird und jeweils die Überstände mit den gelösten Proteinen abpipettiert werden. So bekommt man drei Überstände mit den leicht löslichen Proteinen ( wie z.B. zytosolischen Proteinen ) im ersten Überstand, den Proteinen mit intermediärer Löslichkeit im zweiten und den schlecht löslichen ( z.B. Membranproteine ) im dritten Überstand. Des weiteren erhält man nach der dritten und letzten Extraktion ein unlösliches Pellet, das verworfen wird. Es erfolgt nun eine Proteinbestimmung der Überstände ( Bio-Rad Standard Assay Procedure ) , damit gleiche Mengen bei der folgenden isoelektrischen Fokussierung geladen werden können.

## **2.5 2 D-Gelelektrophorese**

### **2.5.1 Isoelektrische Fokussierung ( 1.Dimension )**

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten. In diesem Gradienten bewegt sich jedes Proteinmolekül zu der Stelle, die seinem isoelektrischen Punkt entspricht. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist jener pH-Wert, an dem seine Nettoladung – die Summe aller negativen und positiven Ladungen an den Aminosäuren-Seitengruppen – null ist. Die IEF ist eine Endpunktmethode, bei der die Proteine auf der gesamten Trennstrecke in scharfe Proteinzonen voneinander abgegrenzt werden.

Idealerweise sollte eine gelungene Probenvorbereitung für die 2 D-Elektrophorese dazu führen, dass die Proteine des Ausgangsmaterials komplett gelöst, deaggregiert, denaturiert und reduziert vorliegen. Störende Substanzen wie Lipide, Nukleinsäuren, Phenole und Salze, die die Qualität der 2 D-Elektrophorese beeinflussen, sollten entfernt werden. Da speziell die Anwesenheit von Nukleinsäuren, vor allem DNA, bei der Auftrennung der Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung zu unerwünschten Wechselwirkungen führt, erfolgt vorher die Gabe von Endonuclease. Somit werden artifizielle Migrationen und Streifenbildung auf ein Minimum reduziert.

Nach der Proteinbestimmung werden die bei der sequentiellen Proteinextraktion gewonnenen Überstände mit einem Rehydratisierungspuffer verdünnt, um die Idealkonzentration ( ca. 1 mg/ml ) für die isoelektrische Fokussierung zu bekommen. Der Rehydratisierungspuffer enthält 10 ml 8 M Urea, 4% 8w/v) CHAPS, 40 mM Tris und 0,2% (w/v) Bio-Lyte 3/10. Die aufgetragene Proteinmenge pro ReadyStrip IPG Strip ( 11 cm, pH 3-10, NL ) beträgt 0,1 mg.

Mit Hilfe der PROTEAN IEF-Cell von Bio-Rad werden 10 elf cm lange IPG-Streifen prozessiert. Die getrockneten IPG-Streifen müssen vor Beginn der eigentlichen Fokussierung 12 Stunden rehydratisiert werden. Dazu pipettiert man die Rehydratisierungslösung mit der gelösten Proteinprobe in die Mitte der einzelnen Vertiefungen des Kunststoffeinsatzes der PROTEAN IEF-Cell und legt die 3mm breiten IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten vorsichtig hinein. Um die Streifen vor Austrocknung bzw. der Auskristallisation des Harnstoffs zu schützen, wird eine ausreichende Menge an Silikonöl auf die Streifen pipettiert. Folgende Parameter werden nach dem Schließen der Fokussierungskammer am Stromversorger der Bio-Rad PROTEAN IEF-Cell für eine analytische Fokussierung eingestellt:

Aktive Rehydratisierung: 12 Stunden

Temperatur: 20 Grad Celsius

S1: 250 V / 15 min

S2: 8000 V / 2 Std.

S3: 8000 V / 35000 Vh

S4: HOLD / 2 Std.

Nach Beendigung der Fokussierung werden die IPG-Streifen in eine Klarsichthülle gesteckt, festgeklammert und bis zur weiteren Verwendung für die SDS-PAGE bei -80 Grad Celsius gelagert ( max. 9-12 Monate ).

## 2.5.2 SDS-PAGE ( 2.Dimension )

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Gelelektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (englisch : sodium dodecyl sulphate, SDS) und trennt Proteine ausschließlich nach Molekülgröße. Die Proteine werden denaturiert und an die Peptidketten lagert sich SDS an, wobei anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen: ca. 1,4 g pro g Protein. Da sich aus diesem Sachverhalt eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen ergibt, kann man mit Hilfe von Markerproteinen eine Eichkurve aufstellen und die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmen.

Aufgrund der begrenzten Reproduzierbarkeit und der Probleme mit der Proteinfärbung müssen immer Mehrfachbestimmungen ( ca. 5-10 Gele der gleichen Probe, möglichst von unabhängigen Aufarbeitungen ) durchgeführt werden, um eine statistisch sinnvolle, quantitative Aussage zu erhalten. Heute lässt sich bei optimal durchgeführten Analysen eine relativ gute Aussage bei Mengenveränderungen im Bereich von >15% treffen; es gibt aber durchaus Proteine, die spezifisch größere Variationen zeigen.

Bevor die zweite Dimension gefahren werden kann, müssen die IPG-Streifen äquilibriert werden. Hierzu werden sie 2 x 10 min in 2 x 10 ml Äquilibrierlösung ( 50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, etwas Bromphenolblau ) geschüttelt. Die Lösung des ersten Äquilibrierschrittes enthält zusätzlich 1% w/v DTT, die des zweiten 260 mM Jodacetamid, um Streifenbildung im gefärbten 2 D-Gel zu vermeiden.

Die 10 äquilibrierten IPG-Streifen werden kurz mit einer Pinzette in Tankpuffer getaucht, luftblasenfrei auf das vertikale SDS-Gel gelegt und mit einem geeigneten Spatel leicht angedrückt. Der IPG-Streifen wird mit heißer Agarose ( 0,5% (w/v) in 1x Elektrodenpuffer ) fixiert. Nach dem Erstarren der Agarose wird das jeweilige SDS-Gel in die Elektrophoreseapparatur ( Criterion Cell, Bio-Rad ) eingesetzt und die Elektrophorese gestartet. Um einen optimalen Proteintransfer zu gewährleisten, wird die Elektrophorese 50-55 Minuten bei 200 V gefahren. Die Trennung wird dann solange fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront das Ende des Trenngels erreicht hat. Die Gelkassette wird dann vorsichtig mit einem Spatel geöffnet und das Gel für die Färbung entnommen.

## 2.6 Proteinfärbung und -darstellung

Um die aufgetrennten Proteine sichtbar machen zu können, werden die Gele mit dem Sypro Ruby Gel Stain von Bio-Rad gefärbt. Zunächst werden die Gele 30 Minuten lang in einer Methanol-Essigsäure-Lösung ( 10% Methanol, 7% Essigsäure ) gewaschen.

Nach diesem Fixationsschritt erfolgt die eigentliche Proteinfärbung mit dem fluoreszierenden Ruby Gel Stain. Dabei werden 50 ml der Färbelösung pro Gel benutzt und die Gele 3 Stunden lang lichtgeschützt gefärbt. Danach erfolgt eine Entfärbung, d.h. es wird nicht gebundener Farbstoff aus dem jeweiligen Gel mit einer Methanol-Essigsäure-Lösung herausgewaschen.

Ruby Gel Stain besitzt zwei Exzitations-Peaks ( 300 nm und 480 nm ) und ein Emissionsmaximum bei 618 nm. Gefärbte Proteine können prinzipiell mit verschiedenen Exzitationsquellen wie z.B. einem 300 nm UV- oder Blue-Light-Transilluminator oder einem auf Laser basierendem System sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe eines Fluor-S MultiImagers von Bio-Rad werden die Gele visualisiert ( Belichtungszeit: 45 Sekunden ), mit einer CCD Kamera digitalisiert und dann auf einem elektronischen Datenträger gespeichert.

## 2.7 Computer-unterstützte Proteindetektion und -quantifizierung

Die Analysesoftware ( PDQuest von Bio-Rad ) ist ein unersetzbares Hilfsmittel bei der Evaluation von komplexen 2-D Gelen. Sie erlaubt:

- die Speicherung und Strukturierung von großen Mengen gesammelter visueller Daten.
- die schnelle und genaue Analyse der gewonnen Informationen.
- die Weitergabe von Daten zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen.
- den Aufbau von 2-D Proteindatenbanken.

Die computer-assistierte Analyse der digitalisierten Gele beinhaltet die Detektion von Spots, die Quantifizierung dieser Proteinansammlungen, den Vergleich der Gele untereinander sowie die statistische Analyse.

Bevor die Software die Proteine eines 2-D Gels automatisch erkennt, müssen störende visuelle Daten korrigiert und der Hintergrund des Gels subtrahiert werden. Des weiteren werden die Proteinspots mathematisch im Sinne von 3-D Gauss-Verteilungen moduliert, damit die Absorptionsmaxima bestimmt werden können. Die jeweiligen Intensitäten der Spots werden dann mit Hilfe der Integration der Gaussfunktion errechnet. Diese mathematische Verarbeitung führt einerseits zu einer Reduktion der Datenmenge, andererseits wird dadurch die Auswertung der Gele beschleunigt. Darüber hinaus können Gelartefakte beseitigt und von der Software nicht erkannte Spots hinzugefügt werden.

Der nächste Schritt bei der Evaluation der 2-D Gele ist die Identifizierung von Proteinen, die in allen Gelen einer Serie ( nach 48 Stunden entnommene Kollateralarterien oder Kontrollgefäße ) vorhanden sind. Diese Aufgabe wird

erschwert durch die Tatsache, dass die Reproduzierbarkeit der Gele Schwankungen aufweist, was sich auf die Position einzelner Proteine im jeweiligen Gel auswirkt. Die Gelanalyse Software muss in der Lage sein, geringe Positionsänderungen von einzelnen Proteinspots innerhalb einer Serie von Gelen zu erkennen. Dabei geht die Software bei der Erkennung bzw. Zuordnung der Spots davon aus, dass sich die relative Lokalisation der Spots zueinander nur geringfügig ändert.

Vor Ablauf des automatischen Gelvergleichs sucht die PDQuest Software das beste 2-D Gel einer Serie als referenz- oder auch Standardgel aus, um dann alle anderen Gele mit diesem zu vergleichen. Damit der automatische Vergleich der Gele genauer vonstatten geht, werden einige sogenannte Landmarks, also identische Spots in einer Gelserie, manuell bestimmt. Mit Hilfe dieser Landmarks versucht die Analysesoftware all diejenigen Spots zu vergleichen, die sehr nahe an diesem Fixpunkt liegen und benutzt dann diese identifizierten Spots als Anfangspunkte für weitere Vergleiche. So wird dann die ganze Geloberfläche systematisch auf das Vorhandensein oder das Fehlen von Proteinspots einer Serie untersucht. Die Ergebnisse des automatischen Gelvergleichs benötigen danach einer Verifizierung, genauso wie die automatische Spoterkennung. Mit der PDQuest Software werden alle Gele eines Experiments als eine Einheit dargestellt. Beim Vergleich von Gelen aus verschiedenen Experimenten werden die Referenzgele untereinander verglichen. Dabei wird jedem Spot automatisch eine Nummer zugeordnet, so dass identische Spots die gleiche Nummer haben. Die experimentell gewonnenen Daten werden dann statistisch analysiert, um festzustellen, welche Proteine in den Kollateralarterien im Vergleich zu den Kontrollgefäßen hoch- oder runterreguliert wurden.



## **2.8 Massenspektroskopie und Sequenzierung**

Hat man Proteine identifiziert, die signifikant hoch- oder runterreguliert sind, werden diese aus dem 2-D Gel herausgeschnitten und durch Proteasen in Peptidketten gespalten. Mit Hilfe eines Massenspektrometers werden Molekulargewicht und Struktur von diesen Peptidenketten bestimmt. Somit kann man die Proteine genau identifizieren. Darüber hinaus stehen noch andere Peptidbestimmungsmethoden zur Verfügung wie z.B. die Mikrosequenzierung nach Edman.

## 2.9 Westernblot

Beim Blotten werden die Proteine eines SDS-Gels oder eines nativen Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Diese membrangebundenen Proteine können dann angefärbt oder ansequenziert werden. Man kann sie mit Antikörpern reagieren lassen, mit Enzymen umsetzen, ihre Derivatisierungen bestimmen oder aber sie auf die Bindung von Liganden und Ionen prüfen. Der Westernblot, der auf eine Immunfärbung beruht, eignet sich ganz besonders als Kontrollmethode, um sequenzierte Proteine im 2-D Gel nachzuweisen.

## 2.10 Bioinformatik

Bei einer Proteomanalyse fallen eine immens große Menge an Daten an, die in einer Form gespeichert werden müssen, die bestimmte Analysen schnell und reproduzierbar ermöglicht. Dabei sind hier nicht nur die Daten der Gelposition, Menge und Identität des Proteins wichtig, es müssen auch alle zum Teil recht unstrukturierten Daten über Herkunft, Herstellung und Bearbeitung der Probe zugänglich sein. Über Links müssen auch andere Datenbanken ( klinische Datenbanken, Raumstruktur-Datenbanken, Literaturdatenbanken ) bei Suchabfragen berücksichtigt werden können, wobei eine Internet-Anbindung ins WWW unerlässlich ist. Eine große Bedeutung kommt auch der Darstellung der Daten und der Resultate der Datenbankabfragen zu. So muss zum Beispiel bei der Untersuchung des Einflusses von potentiellen Pharmaka auf die Proteinexpression deutlich werden, welche Proteine sich wie stark unter dem Einfluss welcher Substanzen in den verschiedenen Experimenten verändern und welche Proteine gemeinsam reguliert werden. Dies sind so komplexe Zusammenhänge, dass die Softwarepakete, die zur Bildverarbeitung und Quantifizierung eingesetzt werden, nur die einfachsten ersten Schritte abdecken können. Heute werden für die Proteomanalyse erste spezielle Datenbanksoftwarepakete entwickelt, die diese Aufgabe übernehmen sollen. Dabei spielt auch die Darstellung der komplexen Resultate eine wichtige Rolle. Zum Beispiel wird in Balkendiagrammen dargestellt, welche Mengen bestimmter Proteine in verschiedenen Experimenten vorhanden sind. In Pfeildiagrammen kann neben Art und Größe der Veränderung ( Zunahme oder Abnahme werden über die Richtung der Pfeile nach oben oder unten, die Mengenveränderungen über den Winkel angegeben ) auch eine statistische Signifikanz der Veränderungen über die Pfeillänge angegeben werden. Beide Arten der Präsentation sind vor allem zur Darstellung einer großen Anzahl von Proteinen in verschiedenen Experimenten geeignet und zeigen

übersichtlich Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Wirkungs- oder Reaktionsmechanismen auf. Proteine mit gleicher Expressionscharakteristik können so erkannt, über Clusteranalyse zusammengefasst und weiter analysiert werden.

## ERGEBNISSE:

### 3.1 Gele und Spotmuster

Es wurden insgesamt zehn Gele hergestellt. Die Gruppe A enthielt die Gele von den zytosolischen Proteinen der fünf Kollateralarterien. Die Gruppe B entsprechend die Gele von den zytosolischen Proteinen der fünf Kontrollgefäße.

Nachfolgend ist exemplarisch ein Gel aus jeder Gruppe sowie dessen prozessierte Formen zu sehen.

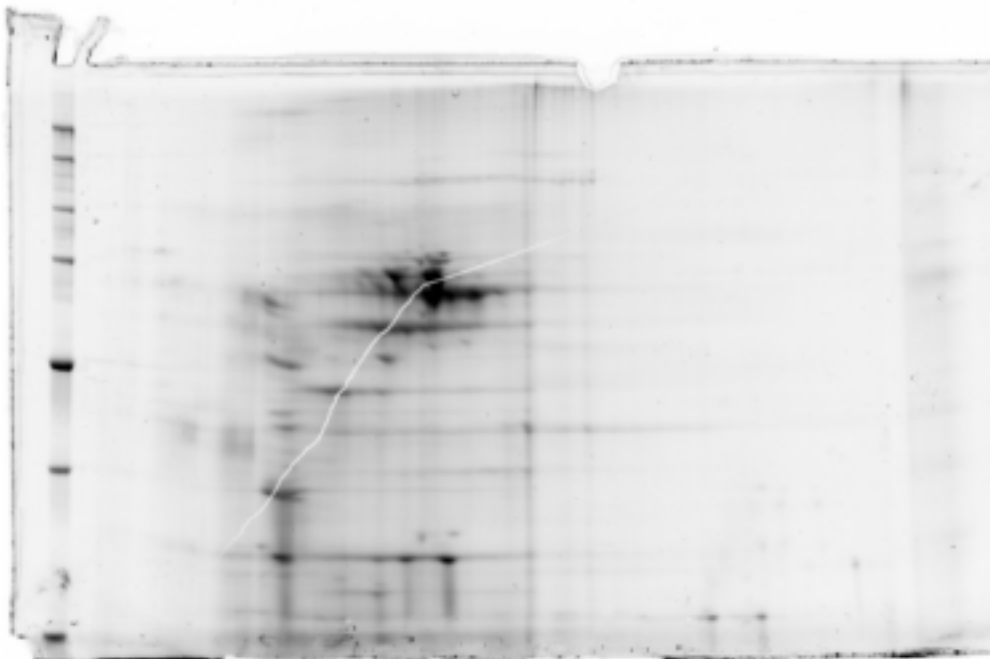


Abb.1: Referenzgel der Gruppe A mit den zytosolischen Proteinen der nach 48 Stunden entnommenen Kollateralarterie

In Abbildung 1 erkennt man auf der rechten Seite die Banden des Proteinstandards, die eine Einschätzung des Molekulargewichts des jeweiligen Proteins zulassen. Ebenfalls deutlich zu sehen sind die Proteinspots.

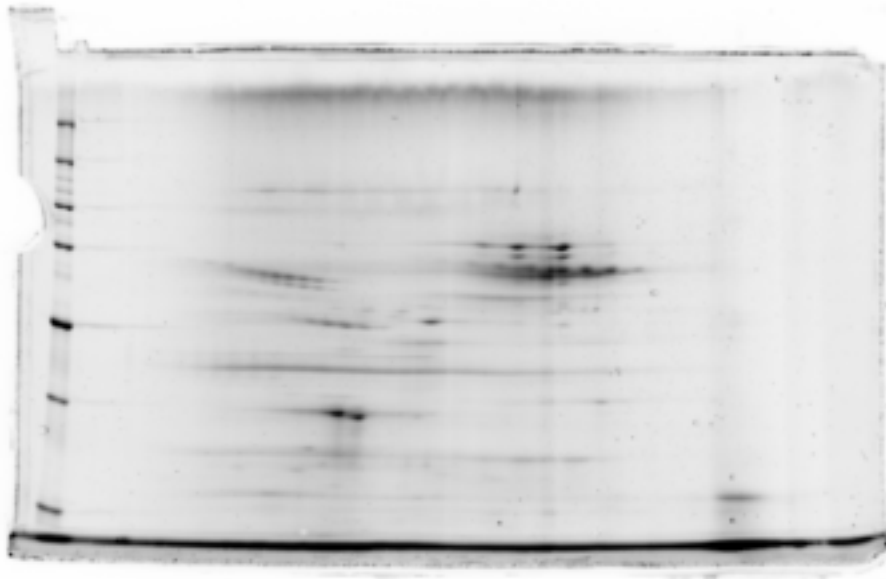


Abb.2: Referenzgel der Gruppe B mit den zytosolischen Proteinen der nach 48 Stunden entnommenen Kontrollarterie

Sowohl Abbildung 1 als auch 2 zeigen die eingescannten Gele bevor sie von der Software PDQuest bearbeitet worden sind.

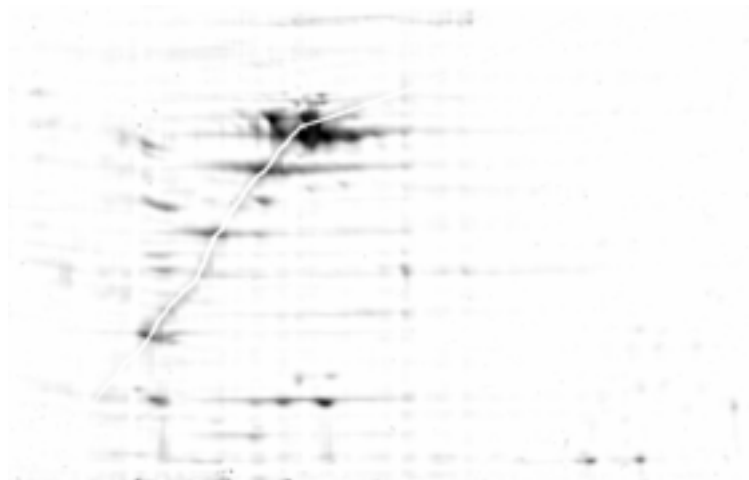


Abb.3: Referenzgel der Gruppe A nach automatischer Spoterkennung

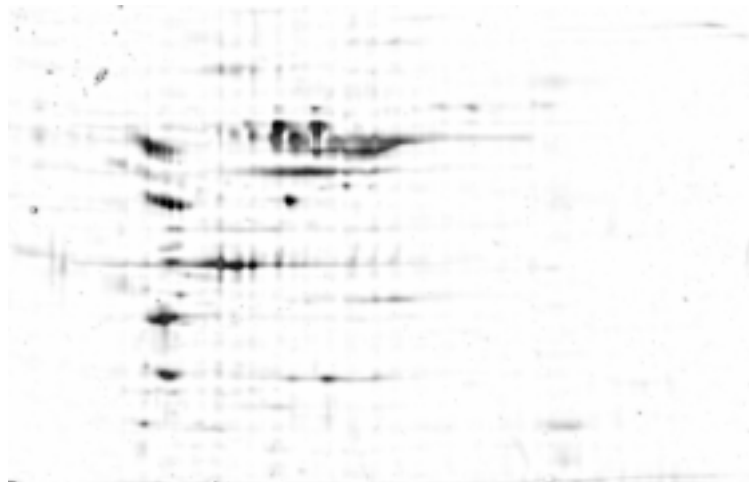


Abb.4: Referenzgel der Gruppe B nach automatischer Spoterkennung



Abb.5: Referenzgel der Gruppe A nach Berechnung der Intensitäten der Spots mit Hilfe der Gaussfunktion

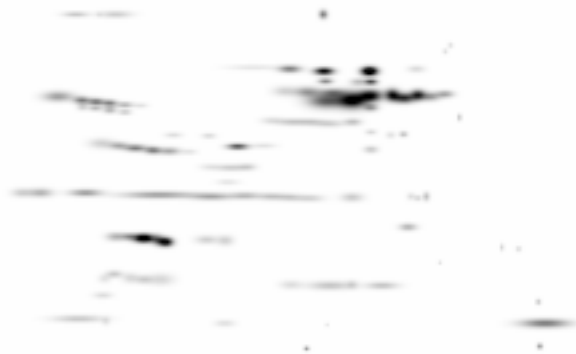


Abb.6: Referenzgel der Gruppe B nach Berechnung der Intensitäten der Spots mit Hilfe der Gaussfunktion

Um statistisch signifikante Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den beiden Gruppen, also den Kollateralarterien und den Kontrollgefäßen, zu finden, wurden die Gele automatisch von der Software verglichen. Die erste Analyse war ein quantitativer Vergleich, die zweite ein statistischer und die dritte eine Boolesche Verknüpfung der beiden ersten. Dabei zeigte sich, dass zwei Proteinspots in den Kollateralgefäßen über das 2,5-fache hochreguliert waren. Diese beiden Spots wurden aus einem Gel herausgestochen und sequenziert. Das Protein mit dem Molekulargewicht um 30 000 D erwies sich als Tropomyosin, das mit dem Molekulargewicht um 70 000 D als Albumin.



### 3.2 Tropomyosin

Tropomyosin ist ein aus zwei Polypeptidketten bestehendes, ca. 40 nm langes Muskelprotein. Es ein wichtiger Bestandteil der dünnen Filamente der Myofibrillen und liegt genau wie Troponin zwischen den Ketten von F-Aktin, wo es die Aktinfilamente stabilisiert und gleichzeitig Bindungsstellen, z.B. für Myosin, blockiert, die durch Kalziumionen aufgehoben werden.

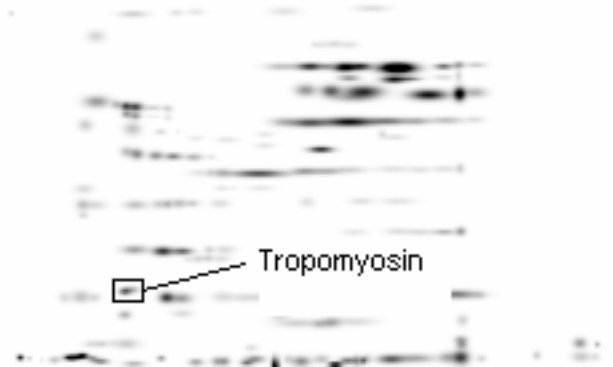


Abb.8: Tropomyosin ( Molekulargewicht: ca. 30 kD ) im Referenzgel

### 3.3 Albumin

Albumine sind in der Leber synthetisierte, gut wasserlösliche globuläre Proteine mit einem hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren, die als Serumalbumin ca. 52-62% des Gesamteiweißes im Blutplasma ausmachen. Eine wichtige Funktion liegt in der Regelung des intravasalen onkotischen. Ferner ist Albumin ein Transportprotein für wasserlösliche Stoffe ( z.B. Bilirubin, freie Fettsäuren ). Albumine kommen auch im Liquor cerebrospinalis, in der Lymphe und anderen Körperflüssigkeiten, im Muskelgewebe und als Laktalbumin in der Muttermilch vor. Der Nachweis gelingt durch Fällungsreaktionen ( z.B. Biuret-, Ninhydrinreaktion ).

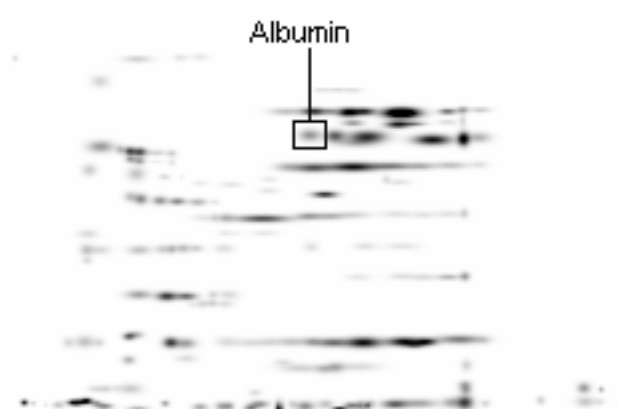


Abb.8: Albumin ( Molekulargewicht: ca. 70 kD ) im Referenzgel

## **DISKUSSION:**

### **4.1 Biphasischer Verlauf der Arteriogenese**

Das Wachstum von Kollateralarterien ist zeitlich limitiert. Man unterscheidet zwei Phasen (11). Die erste Phase der Arteriogenese ist durch eine schnelle Proliferation mit expansivem Wachstum gekennzeichnet. Die zweite, langsamere Phase wird vorwiegend durch longitudinales Wachstum geprägt.

In der ersten Woche nach Okklusion der Arteria femoralis findet die erste schnelle Phase statt. Die Proliferation von Intima und Media sowie die Zunahme des Durchmessers der Kollateralarterien erreichen ein Maximum. Nach sieben Tagen kommt es dann zu einer kontinuierlichen Abnahme der Neointimaformation und des zentrifugalen Wachstums.

Die erste drei Tage der ersten schnellen Phase sind die markantesten, an denen zweidrittel der Proliferation stattfindet. Aus diesem Grunde wurden bei diesem Experiment die Kollateralarterien nach 48 Stunden entnommen. Die Veränderungen und Wachstumsprozesse auf Proteinebene sollten näher durchleuchtet werden.

## 4.2 Initiation des Kollateralarterienwachstums

Folgende Faktoren wurden als Stimulatoren des Kollateralarterienwachstums angesehen (1-4):

- intralumenaler Druck und sein Gradient im Gefäßverlauf
- Schubspannung
- Produkte des ischämischen Metabolismus

Es sprechen jedoch mehrere Gründe gegen eine primäre metabolische Initiation des neointimalen Remodelings (1-4,12,13).

Die Kollateralarterien wachsen nach Rekonstitution des metabolischen Defizites noch tage- und wochenlang weiter. Messungen des Sauerstoffgehaltes und der Ischämiemediatoren im Bereich der Kollateralarterien haben Hypoxie als Stimulus ausgeschlossen und zeigen, dass die Arteriogenese im Gegensatz zur Angiogenese unter normoxämischen Bedingungen stattfindet (12,13).

Anstatt einer zentrifugalen Verteilung der Endothelzellhyperplasie mit Maximum der Proliferation im Ischämiebereich und Abnahme der Proliferation mit der Entfernung vom Hypoxieareal, zeigen die etablierten Modelle einen zentripetalen Proliferationsgradienten des Endothelwachstums, was gegen Ischämie als Initiator der Arteriogenese spricht.

Des weiteren wurde in anderen Experimenten mit proangiogenen Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF oder MCP-1 (14-16) ein positiver Effekt nur im ligierten Bein gezeigt. Das Kontrollbein wies dagegen keine vermehrte Proliferation der Intima und Media auf, so dass man annehmen kann, dass Wachstumsfaktoren erst sekundär nach der Aktivierung des Endothels, z.B. durch Shear Stress, ihre Wirkung entfalten können. 35

So wird vielmehr Shear Stress ( Schubspannung ) als Initiator der Arteriogenese angesehen (17-19). Dieser mechanischer Faktor wird von den Endothelzellen der Kollateralarterien in ein biochemisches Signal umgewandelt.

Die Schubkraft ist der Gradient der Flussgeschwindigkeit in der Nähe der Arterienwand und sie tendiert dazu, die intimale Schicht der arteriellen Wand in Flussrichtung zu deplazieren.

Während des Wachstums der Kollateralarterien kommt es zur Erhöhung von Blutflüssen nach der Ligatur der Magistralarterie und zwangsläufig auch zur Erhöhung der Schubkraft.

Folgende Formel gilt für die Berechnung der Schubspannung:

$$\tau_w = 4\mu Q / \pi r^3$$

Während der Arteriogenese verändern sich drei Komponenten:

- der Radius r der Kollateralarterie nimmt zu
- der Blutfluss Q nimmt ab
- die Gefäßarchitektur zeigt longitudinales und korkenzieherartiges Wachstum

Da diese Veränderungen zu einer Abnahme des Shear Stress führen, kann man sagen, dass während des Kollateralarterienwachstums eine Anpassung an die Schubspannung durch Lumenexpansion und durch neointimale Proliferation in der Gefäßwand stattfindet.

Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass der Shear Stress einen signifikanten Einfluss auf den Endothelzellstoffwechsel ausübt. So synthetisieren Endothelzellen, die Shear Stress ausgesetzt sind, vermehrt vasoaktive Substanzen wie NO.

Mit der Abnahme der Schubspannung infolge luminaler Anpassung an den erhöhten Blutfluss, kommt es dann zu einem Stop des Remodelings in den Kollateralarterien.

### 4.3 Mechanotransduktion

Zur Zeit ist der genaue Transduktionsmechanismus der mechanischen Kraft ( Schubspannung ) in biochemische Prozesse und die daraus resultierende Beeinflussung der Funktion und Form einer Zelle weitgehend ungeklärt.

Jedoch gibt es einige Studien (20), die die Wirkung der Transduktion mechanischer Kraft auf Form und Enzymkinetik der exponierten Zellen nachweisen. Dabei laufen die beobachteten Veränderungen auf der Zytoskelett- und Enzymebene ab. Auf der Zellebene kommt es zum Umbau im Zytoskelett mit konsekutiver Veränderung der Lokalisation und Aktivität der daran angehefteten Zellorganellen und Proteinkomplexen.

Die Tatsache, dass das Zytoskelett einer Zelle ein dynamisches Gebilde ist, erklärt die Fähigkeit zu einer raschen Änderung der Form und Struktur.

So sind Actin-Filamente sind durch Integrine in der Zellmembran eng mit der extrazellulären Matrix verbunden und können so strukturell auf die mechanischen Kräfte von außen auf die Zellmembran mit Polymerisation und Depolymerisation antworten.

#### **4.4 Interpretation der Ergebnisse**

In dieser Arbeit konnten zwei zytosolische Proteine identifiziert werden, die nach Ligatur der Arteria femoralis in Kollateralarterien von Ratten hochreguliert waren.

Der Grund für die erhöhte Synthese von Tropomyosin könnte in der gesteigerten Proliferation der glatten Muskelzellen in Intima und Media während der Arteriogenese liegen.

Es ist durchaus bekannt, dass Tropomyosin in Muskel- und Bindegewebszellen, die einer gewissen Zugspannung ausgesetzt werden, vermehrt synthetisiert wird (21) und dass es bei der Mechanotransduktion eine signifikante Rolle spielt (22).

Die vermeintliche Hochregulation von Albumin lässt sich am ehesten durch eine Blutkontamination der Proben erklären. Dies könnte bei Verwendung entsprechender Filter bei der Probenaufbereitung verhindert werden.



## 4.5 Problematik der Probenaufbereitung

Die Tatsache, dass keine weiteren Proteine gefunden werden konnten, die entweder hoch- oder runterreguliert waren, ist höchstwahrscheinlich mit den Limitationen der Proteomanalyse zu begründen. Eines der Hauptprobleme bleibt die Reproduzierbarkeit der Gele aufgrund der schwierigen Probenaufbereitung. So werden abhängig vom jeweils benutzten Detergens andere Proteine gelöst. Es gelingt nie die Gesamtheit aller Proteine darzustellen. Hauptaufgabe wird es deshalb sein, die zur Zeit noch limitierte Technik der Probenaufbereitung zu verbessern.

Ein ganz zentraler Ansatzpunkt dabei ist die Reduzierung der Probenkomplexität, um die Sichtbarkeit von kleinen Proteinen auf den Gelen zu erhöhen. Techniken wie die differenzielle Extraktion (23), die subzelluläre Fraktionierung (24) sowie die Chromatographie (25) setzen hier an.

Diese Arbeit zeigt somit, dass die 2 D-Gelelektrophorese zur Darstellung des Proteoms pathophysiologischer Zustände nur begrenzt einsetzbar ist. Die verbesserte Trennung der Proteinfractionen unter Zuhilfenahme verschiedener Detergenzien ist daher zentral. Diese werden jedoch für jedes Peptid anders ausfallen (26).

## 4.6 Die Rolle der Proteomanalyse

Unter den entsprechenden Voraussetzungen bieten Proteomanalysen und hier vor allem die automatisierten mit höherer Reproduzierbarkeit sehr interessante Möglichkeiten (27). Die potentiellen Anwendung von Proteomics in der kardiovaskulären Forschung sind vielfältig (28-32).

Es kann untersucht werden inwieweit spezifische pathologische oder pharmakologische Veränderungen das Proteinprofil von Zellen oder Gewebe beeinflussen auch ohne die Notwendigkeit einer Proteinidentifikation. So würden sich bei Optimierung der Techniken zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der Pharmakologie und klinischen Diagnostik ergeben.

In den letzten Jahren wurden die ersten Genome von Organismen vollständig entschlüsselt, und heute befindet sich die Aufarbeitung weiterer Gesamtgenome schon an der Grenze zur Routine. Und obwohl die Genomdaten in den letzten Jahren ihren Wert für die Analyse biochemischer und klinischer Fragestellungen bewiesen haben, bewegt sich der Schwerpunkt des Interesses der Post-Genome-Ära hin zu funktionellen Analysen der einzelnen Gene. Dies wird damit zur eigentlichen Herausforderung an die Wissenschaft der nächsten Generation. Heute erkennt man, dass auch die gesamte Geninformation nur einen begrenzten Einblick in die Komplexität und Dynamik eines lebenden Systems zu geben vermag.

## **ZUSAMMENFASSUNG:**

Diese wissenschaftliche Arbeit zeigt, dass bestimmte biochemische Untersuchungsmethoden aus dem Bereich Proteomics nur bedingt geeignet sind, um nach spezifischen Proteinen zu suchen, die in Kollateralarterien hoch- oder runterreguliert sind. Jeweils fünf CD-Ratten wurden zwei Gruppen zugeteilt. Bei den Tieren der ersten Gruppe wurde nach Ligation der Arteria femoralis 24 Stunden bis zur Gefäßentnahme gewartet, in der zweiten 48 Stunden. Es wurden pro Ratte zwei Gefäße entnommen: eine Kollaterale aus dem ligierten Bein und ein Kontrollgefäß aus dem anderen Bein. Die entnommenen Gefäße wurden direkt nach Entnahme in flüssigen Stickstoff eingefroren. Nach Zertrümmerung und Auftrennen in verschiedene Fraktionen wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Als nächstes erfolgte die 2 D-Elektrophorese, die die Proteine in der ersten Dimension nach isoelektrischem Punkt und in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht auftrennte. Die entsprechenden Gele wurden mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt und eingescannt. Mit Hilfe einer Analysesoftware wurden die Spotmuster der verschiedenen Gele miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass in der zytosolischen Fraktion der 48 Stunden Gruppe zwei Proteine in Vergleich zu den Kontrollgefäßen signifikant ( $>2,5$ -fache) hochreguliert waren. Diese Spots wurden im Gel herausgestochen und zur weiteren Sequenzierung in ein anderes Labor geschickt. Dabei kam heraus, dass es sich am ehesten um die Proteine Tropomyosin und Albumin handelt. Angesichts der Tatsache, dass die Neubildung von glatten Muskelzellen ein entscheidender Vorgang bei der Arteriogenese ist, ließe sich die Hochregulation von Tropomyosin durchaus erklären. Die komparative Proteomanalyse ist also ein interessanter Ansatz, der aber gewiss noch stark verbessert werden muss, um auf langer Sicht die Arteriogenese – Forschung bereichern zu können.

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:**

D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FGF	Fibroblast Growth Factor
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilized pH Gradient
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamide Gelelektrophorese
rpm	rotations per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
WWW	World Wide Web

## **LITERATURVERZEICHNIS:**

**1. Schaper W, Schaper J**

*Collateral Circulation*. Vol. 1; 1993

**2. Carmeliet P**

Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis

*Nat Med*. 2000; 6(4):389-95

**3. Schaper W, Scholz D**

Factors regulating arteriogenesis [In Process Citation]

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), Jul 1 2003, 23(7) p1143-51

**4. Buschmann I, Schaper W**

Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth [Record Supplied By Publisher]

*News Physiol Sci* (), Jun 1999, 14 p121-125

**5. Longland CJ**

*Ann Roy Coll Surg Engl* 13:161 (1953)

**6. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al.**

Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it

*Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50 (1996)

**7. Lubec G, Nonaka M, Krapfenbauer K, Gratzer M, et al.**

Expression of the dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2) in Down syndrome and Alzheimer's disease brain is downregulated at the mRNA and dysregulated at the protein level

*J Neural Transm Suppl* 57, 161-177 (1999)

**8. Cutler P, Bell DJ, Birrell HC, Connelly JC, Connor SC, et al.**

An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity

*Electrophoresis* 20, 3647-3658 (1999)

**9. Fegatella F, Ostrowski M, Cavicchioli R**

An assessment of protein profiles from the marine oligotrophic ultramicrobacterium, *Sphingomonas* sp. Strain RB2256

*Electrophoresis* 20, 2094-2098 (1999)

**10. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W**

The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients

*Electrophoresis* 21, 1037-1053 (2000)

**11. Herzog S, Sager H, Khmelevski E, Deylig A, Ito WD**

Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb.

*Am J Physiol Heart Circ Physiol* (United States), Nov 2002, 283(5) p12012-20

- 12. Ito WD, Arras M, Scholz D, et al.**  
Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion.  
*Am J Physiol* (United States), Sep 1997, 273(3 Pt 2) p1255-65
- 13. Deindl E, Buschmann I, Hoefler IE, et al.**  
Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit  
*Circ Res.* 2001; 89(9):779-86
- 14. Arras M, Ito WD, Scholz D, et al.**  
Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb.  
*J Clin Invest* (United States), Jan 1 1998, 101(1) p40-50
- 15. Ito WD, Arras M, Winkler B, et al.**  
Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion.  
*Circ Res* (United States), Jun 1997, 80(6) p829-37
- 16. Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, et al.**  
Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis.  
*Circ Res* (United States), Mar 21 2003, 92(5) p561-8
- 17. Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, et al.**  
Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density and eNOS expression.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(3):H1380-9
- 18. Unthank JL, Fath SW, Burkhardt HM, Miller SC, Dalsing MC**  
Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat  
*Circ Res.* 1996;79(5):1015-23
- 19. Fath SW, Burkhardt HM, Miller SC, Dalsing MC, Unthank JL**  
Wall remodeling after wall shear rate normalization in rat mesenteric arterial collaterals  
*J Vasc Res.* 1998;35(4):257-64
- 20. Khan S, Sheetz MP**  
Force effects on biochemical kinetics  
*Annu Rev Biochem.* 1997;6:785-805
- 21. Ralphs JR, Waggett AD, Benjamin M**  
Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro.  
*Matrix Biol.* 2002 Jan;21(1):67-74.
- 22. Fajer P**  
Conformational switching in muscle.  
*Adv Exp Med Biol.* 2004;547:61-80.

- 23. Molloy MP, Herbert BR, Walsh BJ, et al.**  
Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis.  
*Electrophoresis* 19, 837-844 (1998)
- 24. Taylor RS, Wu CC, Hays LG, et al.**  
Proteomics in rat liver Golgi complex: minor proteins are identified through sequential fractionation.  
*Electrophoresis* 21, 3441-3459 (2000)
- 25. Fountoulakis M, Takacs MF, Berndt P, et al.**  
Enrichment of low abundance proteins of Escherichia coli by hydroxyapatite chromatography.  
*Electrophoresis* 20, 2181-2195 (1999)
- 26. Hermann T, Finkemeier M, Pfefferle W, et al.**  
Two-dimensional electrophoretic analysis of Corynebacterium glutamicum membrane fraction and surface proteins.  
*Elektrophoresis* 21, 654-659 (2000)
- 27. Tuttle JL, Hahn TL, Sanders BM, Unthank JL, et al.**  
Impaired collateral development in mature rats  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H155, 2002
- 28. Loscalzo J**  
Proteomics in cardiovascular biology and medicine.  
*Circulation* (United States), Jul 29 2003, 108(4) p380-3
- 29. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE**  
Cardiovascular proteomics: evolution and potential.  
*Circ Res* (United States), Apr 27 2001, 88(8) p763-73
- 30. Califf RM**  
Genetics, genomics, proteomics: what is a cardiologist to do?  
*Am Heart J* (United States), Oct 2000, 140(4) pS48-50
- 31. Macri J, Rapundalo ST**  
Application of proteomics to the study of cardiovascular biology.  
*Trends Cardiovasc Med* (United States), Feb 2001, 11(2) p66-75
- 32. Chambers G, Lawrie L, Cash P, et al.**  
Proteomics: a new approach to the study of disease.  
*J Pathol* (England), Nov 2000, 192(3) p280-8

## **DANKSAGUNG:**

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. T. Meinertz für das Überlassen des Themas und die Möglichkeit in seinen Laboren forschen zu dürfen danken. Außerdem geht mein Dank an Herrn Dr. med. Wulf D. Ito für die wissenschaftliche Betreuung sowie an Frau Natalie Obermeyer für die gute Zusammenarbeit. Ebenfalls herzlich danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Buck für die Sequenzierung der Proteinproben.



## **LEBENS LAUF:**

### **Name:**

Björn Kitzing

### **Geburtsdatum:**

18.10.1976

### **Geburtsort:**

Bremen

### **Schulbildung:**

1989-1997 Kreisgymnasium Bargtheide, Schleswig-Holstein, Deutschland

### **Schulabschluß:**

1997      Abitur ( allgemeine Hochschulreife )

### **Zivildienst:**

1997-1998 Universitätskrankenhaus Eppendorf, Chirurgische Klinik

### **Medizinstudium:**

1998-2004 Universität Hamburg

2002      University of Queensland ( Australien ), Famulatur

2003      University of Cambridge ( England ), PJ-Tertial

2004      University of Sydney ( Australien ), PJ-Tertial

### **Beruflicher Werdegang:**

2004      Approbation als Arzt

2004-2005 Assistenzarzt, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,

Herzzentrum, Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie

2005-2006 Assistenzarzt, Klinikum Karlsburg, Herz- und Diabeteszentrum

Mecklenburg-Vorpommern, Klinik für Herz-, Thorax- und

Gefäßchirurgie

**EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe ( Auflage und Jahr des Erscheinens ), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe

.....