

Johannes Striegel

Dr. med.

## **Vergleichende Proteomanalyse zur Pathogenese spontaner cervikaler arterieller Dissektionen**

Geboren am 28. Februar 1976 in Erlenbach am Main

3. Staatsexamen am 22.06.2004 an der Ruprecht- Karls- Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie

Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. C. Grond- Ginsbach

Bei der Mehrzahl der Patienten mit spontanen cervikalen arteriellen Dissektionen (sCAD) liegen in Hautbiopsien ultrastrukturelle Bindegewebsveränderungen vor, die die Kollagenfibrillen sowie die elastischen Fasern betreffen. Daher wurde ein generalisierter Bindegewebsdefekt postuliert, der durch Veränderung der Gefäßwandstruktur zu sCAD prädisponiert. Stammbaumanalysen von Familien, in denen sCAD aufgetreten waren, zeigten eine autosomal-dominante Vererbung der familiären Bindegewebsveränderungen. Ein solcher klassischer Mendel'scher Erbgang spricht für das Vorliegen eines monogenetischen Defektes. Der dem Krankheitsbild zugrunde liegende hypothetische genetische Defekt konnte bis dato weder durch Sequenzanalysen von so genannten Kandidatengenen, noch durch genetische Kopplungsanalysen identifiziert werden. Allerdings konzentrierten sich die wissenschaftlichen Ansätze bisher ausschließlich auf Genomanalysen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine vergleichende Proteomanalyse eines Geschwisterpaares durchgeführt, um mögliche Ursachen der sCAD auf Protein-Ebene zu identifizieren oder gar charakterisieren zu können. Hierbei wies der Bruder die mit sCAD assoziierten ultrastrukturellen Bindegewebsanomalien auf, wohingegen die Schwester im elektronenmikroskopischen Bild eine unauffällige Bindegewebsmorphologie zeigte. Für die Proteomanalyse etablierten wir dermale Fibroblasten aus Hautbiopsien des Geschwisterpaares als Primärkultur. Die Fibroblasten wurden nach entsprechender Wachstumspropagation lysiert und die intrazellulären Proteine isoliert. Anschließend trennten wir das Gesamtproteinextrakt mittels zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) auf. Durch Vergleich des Proteinexpressionsmusters mit Identifikation eventuell unterschiedlich

exprimierter Proteine sollte ein Rückschluss auf die Lokalisation des genetischen Defektes ermöglicht werden.

In dieser Arbeit gelang eine methodische Optimierung und Standardisierung der für die Auftrennung der Proteine aus Dermisfibroblasten eingesetzten 2D-Gelelektrophorese. Beim Vergleich der Proteinexpression des Geschwisterpaares konnten wir insgesamt 7 differentiell exprimierte Proteine reproduzierbar nachweisen. Dabei konnten wir zeigen, dass es im Proteom des Probanden mit den ultrastrukturellen Bindegewebsanomalien zu einer verstärkten oder Neoexpression von vier Proteinen kam. Darüber hinaus konnte für drei weitere Proteine eine verminderte Expression detektiert werden. Allerdings waren die von den SDS-PAGE-Gelen isolierbaren Proteinmengen zu gering, um eine massenspektrometrische Identifikation durchführen zu können. Die unterschiedlich exprimierten Proteine konnten daher nicht eindeutig identifiziert werden. Jedoch konnten wir den isoelektrischen Punkt sowie das Molekulargewicht der unterschiedlich exprimierten Proteine näherungsweise abschätzen. Dabei erwiesen sich die von uns mittels MALDI-Massenspektrometrie und durch Vergleich mit in der Literatur verfügbaren SDS-PAGE-Gele des Fibroblastenproteoms identifizierten Markerspots als hilfreich.

Die Proteomanalyse der vorliegenden Arbeit hat erstmalig gezeigt, dass den mit sCAD assoziierten ultrastrukturellen Bindegewebsanomalien ein komplexer zellulärer Phänotyp zugrunde liegt, der sich durch die differentiell exprimierten Proteine reproduzierbar charakterisieren lässt. Der zum Auftreten von sCAD prädisponierende hereditäre Defekt bedingt wahrscheinlich nicht nur die Veränderung eines einzelnen Proteins, sondern multiple, möglicherweise innerhalb einer Kaskade ablaufende Expressionsveränderungen.

Aufgrund der zahlreichen Unterschiede in der Proteinexpression ist offensichtlich anhand der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methodik der Proteomanalyse von intrazellulären Fibroblastenproteinen ein direkter Rückschluss vom zellulären Phänotyp auf den Genotyp und somit auf die Lokalisation des primären genetischen Defektes nicht möglich. Zur Lokalisation der zugrunde liegenden Mutation des vorliegenden monogenetischen Defektes empfehlen sich daher andere Ansätze wie etwa die genetische Kopplungsanalyse als Ergänzung zur Proteomanalyse. Die Ergebnisse der Arbeit haben jedoch gezeigt, dass die Proteomanalyse zur genaueren Charakterisierung der Auswirkungen auf die Proteinexpression bzw. zum detaillierten Genotyp-/Phänotyp-Vergleich sehr gut geeignet ist.