

EFFEKTE VON POLYMORPHISMEN AUF DIE GESCHLECHTSSPEZIFISCHE
PROTEINEXPRESSION IN GESUNDEN UND HYPERTROPHIERTEN HERZEN
– UNTERSUCHUNGEN AN EINEM MAUSMODELL

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freie Universität Berlin

vorgelegt von

STEFANIE FORLER

aus Landau (Pfalz)

2011

Die Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Klose im Zeitraum von November 2007 bis November 2011 am Institut für medizinische Genetik und Humangenetik , Charité Universitätsklinik Berlin angefertigt.

1. Gutachterin: 1. Prof. Knaus

2. Gutachter: 2. Prof. Klose

Disputation am: 12.06.2012

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Joachim Klose für die Vergabe und Betreuung meines Themas. Durch seine grenzenlose Begeisterung und unermüdlichen Diskutierfreude legte er mir die Proteomforschung sehr ans Herz.

Danke auch an die drei „Mädels“ der AG Regitz-Zagrosek, Dr. Daniela Fliegner, Dr. Christina Westphal und Dr. Carola Schubert die mir in jeder Herzensangelegenheit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danke an die AG Lehrach vom MPI für die mRNA-Sequenzierung und die Züchtung der Mäuse.

Danke auch an meine Kollegen, Dr. Daniela Hartl, Sabine Groebert und Angelika Krajewski für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Yvonne Kläre und Marion Herrmann für die großartige Hilfe im Labor sowie Grit Nebrich und Oliver Klein für die Arbeit an den Massenspektrometern.

Dr. Michael Ahrend danke ich für seine schrittweise Heranführung an die Forschung und sein immer offenes Ohr bei wissenschaftlichen Problemen. Danke, für die schönen Aufenthalte in Ahrweiler.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie. Insbesondere danke ich meinen Eltern, die mich auf allen Wegen bedingungslos unterstützten und mir in allen Höhen und Tiefen zur Seite standen. Danke, dass ihr mir mit Eurer Liebe die Kraft gegeben habt nie aufzugeben. Danke an meinen Bruder und seine Familie. Mattis und Nele haben mir auch in trüben Tagen mit ihrem Kinderlächeln die Sonne gezaubert.

Danke an meinen Freund Manfred, der mit seiner inneren Ruhe und Gelassenheit meine Launen ertragen konnte.

Diese Arbeit widme ich meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-DE	Großgel 2D-Elektrophorese
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
ANT	Adenosin Nukleotid Transporter
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosinriphosphat
B6	C57BL/6J, Mus musculus domesticus
bp	Basenpaare
CC	konsomisches Chromosom
CS	konsomische Mauslinie
d	Diastole
DAVID	Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery tool
EF	Ejektionsfraktion
ERE	Estrogen responsive element
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FS	Fettsäure
GO	Gene ontology
HERS-I	Estrogen/progestin Replacement Study
HR	Herzrate
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IVS	Vorderwand des linken Ventrikels
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KG	Körpergewicht
LVID	linksventrikulärer Intradiameter
LVM	linksventrikuläre Muskelmasse
LVM/KG	Masse des LV in Relation zum KG
LVPW	Hinterwand des linken Ventrikels
MH	Myokardhypertrophie
MHC	Myosin schwere Kette
MLC	Myosin leichte Kette
Mybpc3	Myosin Bindungsprotein C
Myh6	α-Myosin schwere Kette
Myh7	β-Myosin schwere Kette
Myl2	regulatorische Myosin leichte Kette 2
Myl3	Myosin leichte Kette 3

INHALTSVERZEICHNIS

m/z	Masse/Ladung
NADH ₂	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
pI	isoelektrischer Punkt
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
PW	Hinterwand
PWD	PWD/Ph; Mus musculus musculus
QTL	Quantitative Trait Loci
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
s	Systole
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sham	scheinoperiert
SPF	spezifiziert pathogenfreier Status
SRX	sex-determining region of Y
TAC	transversale Aortenkonstriktion
TDF	Testis-determinierender Faktor
Th/r	Dilatationskoeffizient
Tnnt2	Troponin T
Tnni2	Troponin I
Tnnc1	Troponin
U	Gleichspannung
V	Wechselspannung
WHI	Women´s Health Initiative Study

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	
1	Einleitung 1
1.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen 1
1.2	Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz 2
1.3	Genetische Ursachen myokardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz 3
1.4	Geschlechterentwicklung 5
1.5	Geschlechterunterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen 5
1.6	Der kontraktile Apparat und deren Funktion 8
1.7	Die Proteine des kontraktilen Apparates 9
1.8	Rolle des Myokardstoffwechsels bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz... 11
1.9	Geschlechtsspezifische Aspekte des Myokardstoffwechsels bei Myokardhypertrophie 13
1.10	Die Mausinzuchtstämme C57BL/6J und PWD/Ph 14
1.11	konsomische Mausstämme: Entstehung und Anwendung 15
1.12	Ziel der Arbeit 17
2	Material und Methoden 18
2.1	Material 18
2.1.1	Geräte und Zubehör 18
2.1.2	Verbrauchsmaterial 19
2.1.3	Chemikalien 20
2.1.4	Puffer und Lösungen 22
2.1.5	OP-Zubehör 24
2.2	Methoden 25
2.2.1	Versuchstiere und Gewebepreparationen 25

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.2	Proteinextraktion	25
2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.2.4	Großgel 2D-Elektrophorese	27
2.2.5	Die erste Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)	29
2.2.6	Die zweite Dimension: SDS-PAGE	30
2.2.7	Silberfärbung von 2D-Gelen.....	30
2.2.8	Auswertung der Proteinmuster.....	31
2.2.9	Identifizierung der Proteinspots durch die Massenspektrometrie	32
2.2.10	In-Gel Verdau.....	33
2.2.11	Präparieren der Peptide für die MALDI-TOF/TOF	33
2.2.12	MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie	34
2.2.13	Elektronenspray Ionisierung (ESI)-Massenspektrometrie.....	36
2.2.14	Datenbanksuche auf Grundlage der Peptidmassenfingerabdruck-Spektren ...	37
2.2.15	Der diskontinuierliche Western Blot (Semi-dry-Blotting)	38
2.2.16	Untersuchungen der Hypertrophie an Mausmodellen.....	39
2.2.17	Statistische Auswertung.....	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Untersuchung der parentalen Maus-Stämme (C57BL/6, PWD/Ph und F1(B6*PWD))	47
3.1.1	Vergleich der Phänotypen zwischen den parentalen Stämmen in beiden Geschlechtern.....	47
3.1.2	Alterierende Proteine der Elterntiere im Vergleich.....	49
3.1.3	Klassifizierung der Proteinvarianten der parentalen Stämme	51
3.2	Untersuchung der konsomischen Mausstämmen	53
3.2.1	Vergleich der Proteinmuster der konsomischen Stämme	53

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2	Klassifizierung der varianten Proteinspots der konsumischen Stämme	55
3.2.3	Klassifizierung der geschlechtsspezifischen Proteinspots der konsumischen Stämme.....	58
3.2.4	Alpha-1-antitrypsin: das bekannte geschlechts-spezifische Protein	59
3.2.5	Testen der alterierenden Proteine von Proteingemischen auf ihre Signifikanz	59
3.2.6	Testen der Abhängigkeit zwischen den Proteinen, den Genen/Chromosom sowie den Genen mit SNPs/Chromosom in männlichen und weiblichen konsumischen Stämmen.....	60
3.2.7	Beziehung der varianten mRNAs zur Anzahl der SNPs und der Anzahl der Gene	64
3.2.8	Beziehung der Proteine zwischen den cis- und trans-mRNAs.....	67
3.3	Induzierte Hypertrophie in männlichen und weiblichen CS14- und B6-Mäusen	68
3.3.1	Vergleich der Phänotypen zwischen B6 und CS14 vor der Hypertrophieentwicklung.....	68
3.3.2	Bestimmung der phänotypischen Merkmale während der Hypertrophieentwicklung der CS14-Mäuse.....	69
3.3.3	Vergleich der Proteinmuster neun Wochen nach der TAC-Induktion	74
3.3.4	Klassifizierung der veränderten Proteinspots.....	75
4	Diskussion.....	78
4.1	Einfluss von Geschlecht und genetischer Variabilität auf Herzphänotypen von parental Stämmen und CS-Mäusen.....	79
4.2	Proteomanalyse von CS und parental Mäusestämmen bei Männchen und Weibchen	82
4.3	Veränderte Proteinfunktionen der CS und der parental Stämme bei Männchen und Weibchen	84
4.3.1	Proteinveränderungen im Energiestoffwechsel.....	84
4.3.2	Proteinveränderungen im kontraktilem Apparat.....	86

INHALTSVERZEICHNIS

4.4	Geschlechtsspezifische Expression und Funktion von varianten Proteinen aus CS-Mausstämmen.....	88
4.5	Vergleichende Untersuchungen zur Variabilität der Proteine und mRNA bei CS ...	89
4.6	Einfluss von Geschlecht und genetischer Variabilität im Proteom auf den Schweregrad von Herzhypertrophie.....	90
4.7	Limitation des Krankheitsmodelles.....	94
4.8	Ausblick.....	95
5	Zusammenfassung.....	96
6	Summary.....	98
7	Literaturverzeichnis.....	100
	Anhang.....	I
	Abbildungsverzeichnis	LXIX
	Tabellenverzeichnis	LXXII
	Publikationen	LXXV

1 EINLEITUNG

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen oder besser bekannt als Herz-Kreislauf-Erkrankungen, steigen in den westlichen Industrienationen exponentiell an. Hinsichtlich Mortalität und Morbidität stehen diese Erkrankungen vor Krebserkrankungen weltweit an erster Stelle (Abbildung 1) [1]. Eine Reihe unterschiedlicher Ursachen ist dafür verantwortlich. Eine entscheidende Rolle spielt der ungesunde Lebensstil und somit ein weitverbreitetes Aufkommen diverser „Zivilisationserkrankungen“, wie Adipositas oder Diabetes mellitus. Die sogenannte „Wohlstands-Gesellschaft“ zahlt sich hierbei aus. Nikotinkonsum, geringe körperliche Aktivität, erhöhter Alkoholkonsum, fettreiche und ballaststoffarme Ernährung, psychischer Stress und das Alter gelten als eigenständige Risikofaktoren für Karzinome und koronare Herzerkrankungen [2]. Über 80% aller kardiovaskulären Erkrankungen lassen sich durch die genannten Risikofaktoren erklären [2]. Die übrigen 20% sind genetisch bedingt. Eine genetische Prädisposition liegt z.B. bei Krankheitsbildern, wie arterielle Hypertonie, Myokardinfarkt und Arteriosklerose vor [3]. Ursachen hierfür können unter anderem in Erkrankungen des allgemeinen Metabolismus, Veränderungen im Mitochondriengenom, Strukturveränderungen in Chromosomen, Mutationen, Deletion oder Duplikation von größeren Gen-Abschnitten liegen [3].

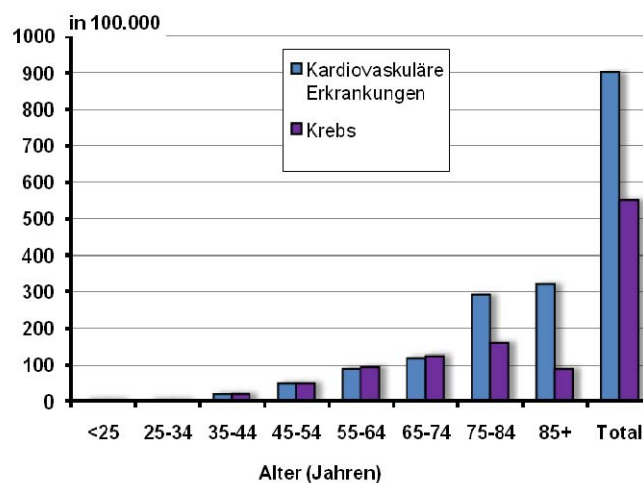


Abbildung 1: Mortalitätsrate der westlichen Industrieländer. Kardiovaskuläre Erkrankungen (blau) und Krebs (violett) steigen in ihrem Vorkommen exponentiell an. Bis zum 74. Lebensjahr zeigen die beiden Krankheiten ähnliche Häufigkeit in ihrer Mortalität. Ab dem 75. Lebensjahr sterben mehr als doppelt so viele Herzpatienten als an Krebs erkrankte Personen. Total gesehen stehen kardiovaskuläre Erkrankungen an erster Stelle der Statistik in den westlichen Industrieländern (modifiziert nach Braun und Strasser, 2006 [1]).

1.2 Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Die linksventrikuläre Myokardhypertrophie (MH), eine pathologische Vergrößerung des Herzens, spielt bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle. In klinischen Studien wurde die kardiale Hypertrophie als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung von Herzinsuffizienz, Ischämien, Arrhythmien bis hin zum plötzlichen Herztod erkannt [4, 5]. MH entsteht unter anderem als Folge einer ständigen Druckbelastung auf das Myokard, wie z.B. durch Aortenstenose. Zunächst entsteht eine konzentrische (adaptive) Hypertrophie. Charakteristisch hierbei ist eine Wandverdickung bei erhaltender systolischer Funktion. Durch die anhaltende Druckbelastung entwickelt sich die konzentrische Hypertrophie zur exzentrischen (maladaptiven) Hypertrophie. Merkmale sind ein Verlust der systolischen Funktion mit folgender Wandverdünnung. Die Folge ist eine Herzinsuffizienz (Abbildung 2) [5]. Anzeichen einer maladaptiven Hypertrophie sind Dilatation und Kontraktionsverlust des linken Ventrikels [6, 7].

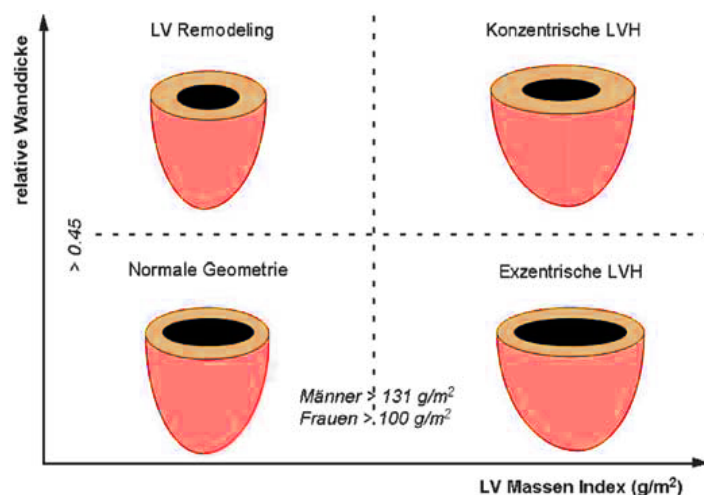


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hypertrophieformen. Konzentrische Hypertrophie entsteht durch chronische Druckbelastung und führt zunächst zur Wandverdickung bei erhaltender systolischer Funktion. Durch die anhaltende Druckbelastung entwickelt sich die konzentrische Hypertrophie zur exzentrischen Hypertrophie. Die Merkmale sind Verlust der systolischen Funktion und Wandverdünnung (modifiziert nach Weil und Schunkert, 2006 [8]).

Die MH ist mit einer Vielfalt von negativen Ereignissen assoziiert. Charakteristisch hierfür sind die Veränderungen im kardialen Metabolismus sowie Umbauprozesse auf struktureller und mechanischer Ebene in den Kardiomyozyten [9]. Ischämie, Diabetes mellitus, Myokardinfarkt oder andere pathologische Stimuli führen in der Zelle zu oxidativem Stress unter Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezien (ROS), welchen den kardialen Metabolismus beeinflussen. Die Folge sind Stoffwechselveränderungen mit einhergehendem

Substratwechsel. Dabei findet eine Verschiebung von Fettsäureoxidation zur Glukoseutilisation statt [10].

Makroskopische und mikroskopische Veränderungen der Herzstruktur entstehen bei Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Begleitet wird diese von Prozessen wie Fibrose und Apoptose. Eine konzentrische MH stellt häufig einen adaptiven Mechanismus zur Kompensation eines chronischen Anstiegs der Arbeitslast dar. Langfristig gesehen kommt es jedoch zur Fibrosierung des Herzmuskels sowie zur exzentrischen Hypertrophie; wobei Herzinsuffizienz die Folge ist [6, 11]. Diese Umbauprozesse werden im Allgemeinen als „*Remodelling*“ bezeichnet (Abbildung 2) [12].

Die linksventrikuläre Hypertrophie ist ein Vorläufer der Herzinsuffizienz [7, 13] und ein unabhängiger Risikofaktor für die Morbidität und Mortalität in kardiovaskulären Erkrankungen [14, 15].

1.3 Genetische Ursachen myokardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Neben Umweltfaktoren wie Stress, Fehlernährung und ungesundem Lebensstil sind genetische Ursachen bei der Entstehung und im Krankheitsverlauf kardiovaskulärer Erkrankungen von Bedeutung. Einerseits können genetische Ursachen durch Polymorphismen verursacht werden, andererseits durch Mutationen. Polymorphismen, wie Single Nukleotid Polymorphismen (SNP), sind Genvarianten, deren Auftretenshäufigkeit bei über 1% liegt (bei Mutationen unter 1%). Bei SNPs findet ein Austausch zwischen zwei Nukleotiden auf den DNA-Strängen statt. Liegt dieser Austausch innerhalb eines Codons, können die genetischen Informationen verändert sein; das Triplet codiert für eine andere Aminosäure als zuvor (nicht-synonyme SNPs). Codiert das Triplet trotz SNP für die gleiche Aminosäure, entspricht dies synonymen SNPs. Nicht-synonyme SNPs können die Genregulation stören und folglich Proteinveränderungen zur Folge haben, welche unter Umständen zu physiologischen Defekten führen können [16]. Solche SNPs spielen in der Wissenschaft auf der Suche nach Chromosomenabschnitten mit Einfluss auf die Ausprägung von quantitativen Merkmalen (quantitative trait loci; QTL), eine wichtige Rolle [17]. SNPs scheinen für die Entstehung von Krankheiten nicht maßgeblich zu sein, sondern nur in Verbindung mit Mutationen. Hier können sie als Modifier der Krankheit wirken. Genetisch werden Herzkrankheiten in unterschiedliche Kategorien eingeteilt: monogene Erkrankungen, polygene Erkrankungen und multifaktorell bedingten Erkrankungen. Unter monogenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen werden Mutationen in bestimmten Proteinklassen verstanden, welche unterschiedliche Auswirkungen auf die Entstehungsformen von Kardiomyopathien zeigen [18]. Eine dilatative Kardiomyopathie erfolgt durch Mutationen in

Genen des Kalziumstoffwechsels, im Dystrophin-Komplex oder in Mutationen der Gene des Zytoskeletts. Wohingegen Polymorphismen im kontraktilen Apparat (Myosin-Bindungsprotein C (Mybpc3)), in den α - und β -Formen der schweren Myosinketten (Myh6 und Myh7), die regulatorischen Einheiten der Myosin-Leichtketten 2 und 3 (Myl2 und Myl3) oder in den Troponinen (Tnnt2, Tnni2 und Tnnc1) [19] zur hypertrophen Kardiomyopathie führen können. Neben diesen beiden monogenen Krankheitstypen entwickeln sich auch polygene Krankheitsbilder. Hier finden genetische Varianten in den sarkomerischen Proteinen [19-22], den Z-Scheiben Proteinen und in den Mitochondrien statt [8]. Das Ausmaß des Krankheitsverlaufes ist abhängig von der Anzahl der Mutationen und der Proteingruppen. So bilden Mutationen in Tnnt2 oder Mybpc3 eine milde Hypertrophieform aus, wohingegen Kombinationen mehrerer Mutationen eine schwere Myokardhypertrophie induzieren (Abbildung 3) [23, 24]. In Bezug auf Myokardhypertrophie wurden bisher keine Daten veröffentlicht, die auf eine genetische Erkrankung hinweisen.

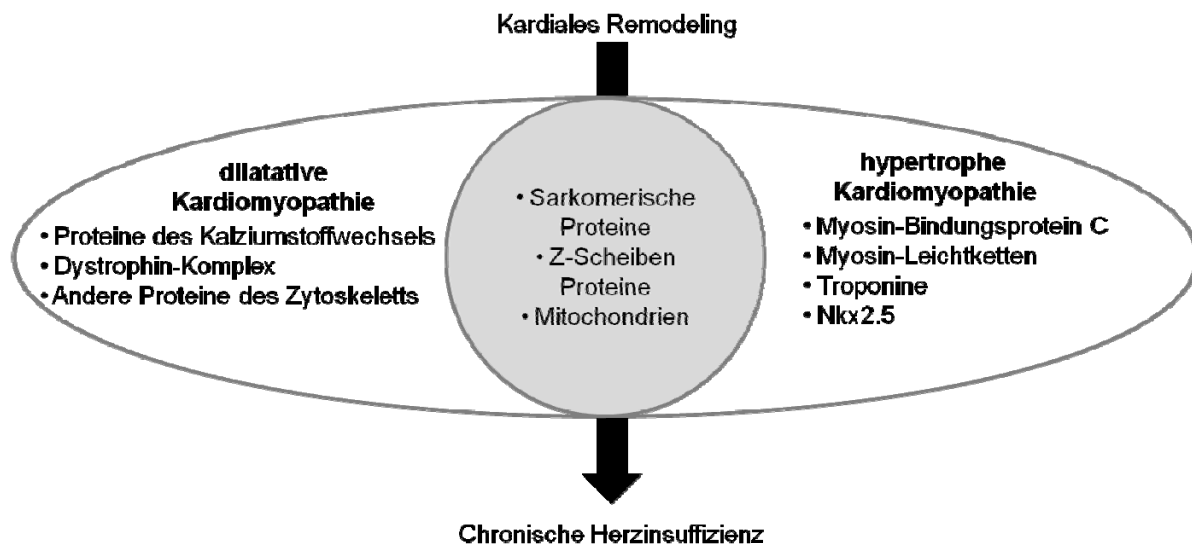


Abbildung 3: Genetische Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz. Je nach genetischer Ursache entwickelt sich entweder eine dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie bzw. eine Mischform (polygene Erkrankung) (mitte) (modifiziert nach Weil und Schunkert [8]).

Eine genetische Diagnostik ist aufgrund der Vielzahl von möglichen Mutationen, die in einem Protein zu Aminosäureveränderungen führen können noch schwierig. Dennoch können im Vorfeld bestimmte Assoziationen eines SNPs mit der Krankheitsausprägung erkannt werden. Mit Hilfe von SNP-Chips werden kranke und gesunde Individuen genotypisiert und das relative Risiko, ein Träger der untersuchten Krankheitsmerkmale zu sein, bioinformatisch kalkuliert [19]. In der vorliegenden Arbeit sollen SNPs, die eine Rolle in kardialen Krankheitsbildern spielen, gefunden und untersucht werden. Hierfür wird es von Bedeutung sein, ob die genetischen Veränderungen sich auch auf Proteomebene

widerspiegeln und inwieweit diese sowohl im gesunden als auch im kranken Modell phänotypisch variieren.

1.4 Geschlechterentwicklung

In der Genetik unterscheidet sich das männliche und weibliche Geschlecht an ihren Geschlechtschromosomen X und Y. Das X-Chromosom entspricht mit ca. 166 Millionen Basenpaaren rund dem Zehnfachen des Y-Chromosoms (15 Millionen Basenpaare) (www.ensemble.org). Durch das homozygote Vorliegen der X-Chromosomen im weiblichen Geschlecht wären eine bedeutend höhere Anzahl an Geninformationen als in männlichen Individuen vorhanden, welches nur ein X-Chromosom besitzt. In der frühen Embryonalentwicklung erfolgt eine X-Inaktivierung eines X-Chromosoms in weiblichen Organismen, welches dadurch in ihrer Genexpression eingeschränkt wird [25]. Die so genannten pseudoautosomalen Gene, (Gene, die auf X und Y identisch sind) bleiben dabei erhalten. Welches von beiden X-Chromosomen inaktiviert wird, erfolgt zufällig. Durch dieses Zufallsprinzip können sogar bei eineiigen Schwestern phänotypische Unterschiede auftreten. Das inaktivierte X-Chromosom bleibt dem Körper als Barr-Körperchen erhalten. Es dient der Regulation der Genexpression und kann in bestimmten Entwicklungsstadien der Keimbahn wieder aktiviert werden [26]. Die Gonadenentwicklung erfolgt in der Embryonalphase zunächst geschlechtsunspezifisch. In der siebten Woche der Embryogenese wird das *sex-determining region of Y* (SRY)-Gen transkribiert, welches den Testis-determinierenden Faktor (TDF) codiert. TDF fungiert als Transkriptionsfaktor und ist durch die Regulierung verschiedenster Genexpressionen für die Geschlechtsdifferenzierung verantwortlich: somatische Zellen entwickeln sich zu testosteronproduzierenden Leydig-Zellen, welche wiederum die Testis bilden. Liegt TDF nicht vor, entwickeln sich die östrogenproduzierenden Ovarien [27].

1.5 Geschlechterunterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen

Durch Verbesserung der sozialen, trophologischen und hygienischen Verhältnisse sowie durch Fortschritte in der Medizin, können in den westlichen Industrienationen steigende Lebenserwartungen erfaßt werden. So lag die durchschnittliche Lebenserwartung in Deutschland um 1900 bei ca. 45 Jahren. Heute liegt sie für Männer bei 75,6 und für Frauen bei 81,3 Jahren [28, 29]. Typische altersbedingte Krankheitsbilder, wie z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen steigen mit der ansteigenden Lebenserwartung signifikant in Morbidität und Mortalität an. Historisch gesehen, ist der Glaube an ein vorwiegend in Männern auftretendes Krankheitsbild nach wie vor weit verbreitet. Statistische Daten zeigen allerdings ein anderes

Bild: mit 55% liegt der prozentuale Anteil der Todesfälle durch kardiovaskuläre Erkrankungen bei Frauen höher als bei Männern mit 43%. Auch liegt die Todesursache bei Frauen durch Herzerkrankungen höher als durch Tumorerkrankungen. Dadurch, dass Frauen eine durchschnittlich 10 bis 20 Jahre spätere Inzidenz als Männer haben, sind hauptsächlich Frauen im höheren Alter betroffen [1, 15, 30, 31]. Erkrankten Frauen jedoch zu einem früheren Zeitpunkt (im Alter zwischen 40 und 50) ist die klinische Prognose für die Patientinnen schlechter [32].

Morphologische Unterschiede zeigen sich unter physiologischen Bedingungen zwischen den Geschlechtern. Bei Erwachsenen gleichen Alters, gleicher Körpergröße und gleichem Gewicht, zeigen Männer 25-38% mehr linksventrikuläre Masse als Frauen. Dannenberg und Kollegen zeigten bei erwachsenen Frauen ein altersabhängiges, stetiges Wachstum des linken Ventrikels, wohingegen er bei Männern konstant blieb [33]. Andere Studien gehen vom gegenteiligen Fall aus: bei Frauen bleibt die Zahl und das Volumen der Kardiomyozyten konstant, bei Männern nimmt die Kardiomyozytenzahl dagegen ab und das Volumen der Zellen zu, d.h. die Masse des linken Ventrikels bleibt bei Frauen gleich, bei Männern nimmt sie ab [34]. Eine mögliche Ursache dafür scheint der Hormonstatus zu sein. Mit zunehmenden Alter verändert sich der Hormonspiegel in beiden Geschlechtern. Bei Frauen erfolgt ein drastischer Östrogen-Abfall nach der Menopause und die ovarielle Testosteronproduktion nimmt gleichzeitig zu [35, 36]. Bei Männern nimmt die Testosteronproduktion mit steigendem Alter ab [37].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Männer im Vergleich zu gleichaltrigen prämenopausale Frauen generell häufiger zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen tendieren. Nach der Menopause steigt die Anzahl der erkrankten Frauen jedoch drastisch an [38]. Ein weiterer wichtiger Anhaltspunkt für die Rolle der Östrogenfunktion im Herzen zeigen Untersuchungen an Kindern. Morphologische, geschlechtsspezifische Unterschiede des linksventrikulären Herzmuskels sind bei Kindern vor der Pubertät kaum zu erkennen [39].

Neben geschlechtsspezifischen Unterschieden im Erscheinungsalter der Krankheit, der Überlebensrate und der Morphologie, zeigen sich auch Differenzen in der Manifestation und in der Prävalenz der Komorbidität zwischen Mann und Frau [30-32]. In zwei Kohorten-Studien, *Euro Heart Failure survey programme* und *Framingheart study* wurden Geschlechterunterschiede in der Ätiologie, in der Pathophysiologie und in der Symptomatik von Herzkreislauf-Erkrankungen untersucht und dargestellt. So wurde z.B. der genetische Einfluß auf Bluthochdruck sowie die Bedeutung von Adipositas auf koronare Herzerkrankungen erkannt [40-42].

Beim gleichen Grad einer mechanischen Belastung, wie Aortenstenose, zeigen Frauen in der Regel eine bessere myokardiale Funktionen als Männer [43]. So scheinen Frauen häufig einen späteren systolischen Funktionsverlust des Herzmuskels zu erfahren als Männer und entwickeln dadurch eher eine ausgeprägte konzentrische Hypertrophie mit einem geringeren enddiastolischen Ventrikeldurchmesser [43-46]. Ist die linken Ventrikelmasse bei Frauen und Männern gleich, zeigt sich, dass die Herzen bei Frauen eher zur Verdickung der Herzwänden neigen und Männer in der Regel zu Ventrikeldilatation [47]. Generell ist zu sagen, dass der Verlauf systolischer Herzinsuffizienzen geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen [48-53] und die Herzinsuffizienzen bei Frauen häufig durch isolierte oder dominierende diastolische Dysfunktionen charakterisiert sind [42, 46, 48, 49].

Wie bereits erwähnt, erkrankten Frauen nach ihrer Menopause häufiger an Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Männer. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass Östrogen im kardiovaskulären System eine Art Schutzfunktion darstellt. In zwei Kohorten-Studien, *Estrogen/progestin Replacement Study (HERS-I)* und *Women's Health Initiative Study (WHI)* konnte diese Hypothese bestätigt werden [54-56]. Eine Hormontherapie mit Östrogen/Progestin führte zwar zu dem gewünschten Effekt eines verminderten Erkrankungsrisikos koronarer Krankheiten, allerdings zeigte die Hormontherapie problematische Nebenwirkungen, wie Schlaganfall und Brustkrebs [57].

Es sind deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Physiologie und Pathologie des Herzens zu erkennen. Vorallem nach einer chronischen Druckbelastung demonstrieren Frauen altersbedingte Unterschiede im ventrikulären „Remodeling“ sowie in Adaptionprozessen als Antwort auf z.B. Bluthochdruck und Myokardinfarkt [58].

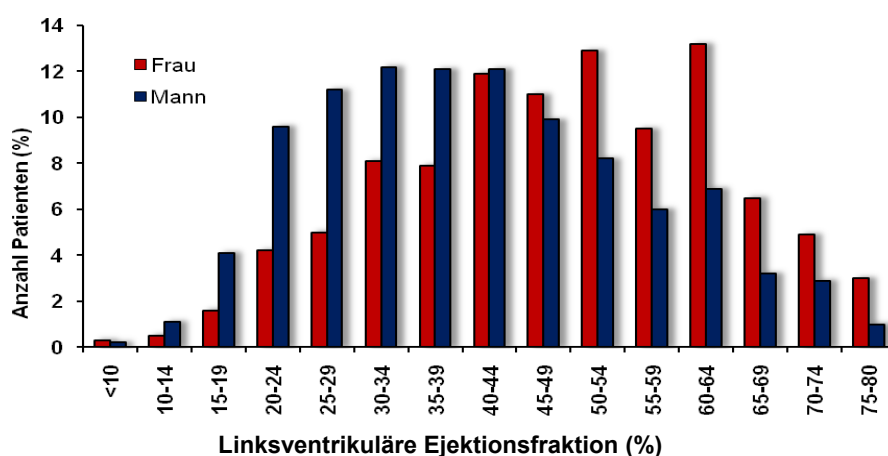


Abbildung 4: Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) (in %) bei Männern und Frauen. Eine systolische Dysfunktion ist charakterisiert durch eine verminderte linksventrikuläre Auswurfraction (EF). 51% aller untersuchten Männer (n=3249) und 28% aller Frauen (n=2048) zeigten eine EF unter 40%. Somit leiden häufiger Männer unter einer systolischen Dysfunktion als Frauen (modifiziert nach Cleland et al. 2003 [42]).

1.6 Der kontraktile Apparat und deren Funktion

Aufgebaut ist das Herz aus einer spezialisierten Form der quergestreiften Muskulatur, die hierarchisch strukturiert ist (Abbildung 5A): Faserbündeln, Muskelfasern, Myofibrillen und Sarkomer. Besonders in den Muskelfasern liegen in hohen Konzentrationen in den dünnen Myofilamenten das Protein Aktin und in den dicken Filamenten das Protein Myosin vor. Das Sarkomer bildet die funktionelle Grundlage der myozytären Kontraktilität und ist durch ein Bündel dünner, dicker und elastischer Fasern charakterisiert [20-22, 59]. Getrennt werden die Sarkomere durch die Zwischen-Scheiben (Z-Scheiben), dessen Hauptproteine Aktin, Titin und α -Actinin sind. Neben der Z-Scheibe besitzt das Sarkomer weitere Banden: 1. die Isotrop-Bande (I-Bande), welche nur Aktinfilamente und keine Myosinfilamente enthält, 2. die Mittel-Bande (M-Bande) mit ausschließlich Myosinfilamenten und 3. die Anisotrop-Bande (A-Bande), die Myosin- und Aktinfilamente miteinander vereint (Abbildung 5B) [59, 60].

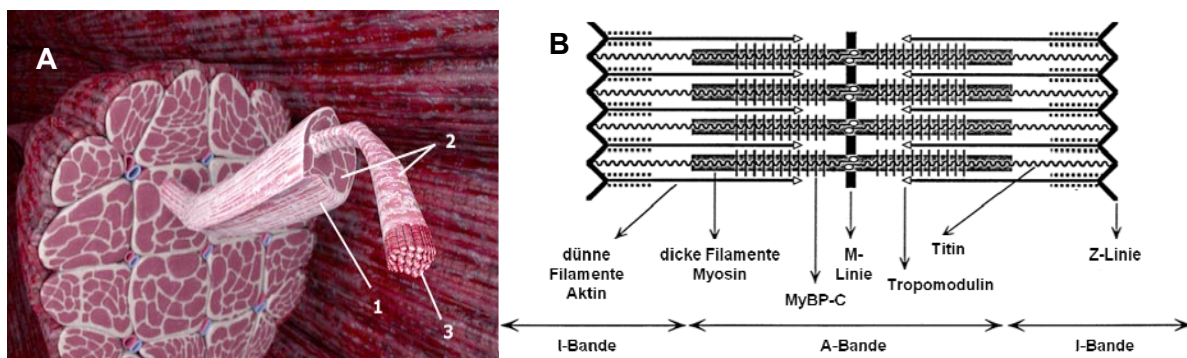


Abbildung 5: einzelne Organisationsebenen des quergestreiften Muskels. A: grober Aufbau eines Muskels 1: Faserbündel; 2: Muskelfaser; 3: Myofibrille (www.iatrum.de/Bilder/muskulatur/muskulatur-de). **B:** Schematische Abbildung des Sarkomers. Z-Linie: Zwischen-Scheibe; M-Linie; Mittel-Bande; I-Bande: isotrop Bande; A-Bande: anisotrop-Bande (modifiziert Schaub [61]).

Histologisch betrachtet, besitzt die quergestreifte Muskulatur einzelne, elektrisch gekoppelte Zellen (Kardiomyozyten), welche im Gegensatz zu den Skelettmuskelzellen dauerhaft synchron kontrahieren und dadurch einen gleichmäßigen Herzschlag erreichen. Diese Synchronität der Myozyten-Kontraktion wird unter anderem durch folgende Parameter beeinflusst: 1. Funktion und Struktur kontraktiler Proteine, 2. elektromechanische Kopplungen (wie Calciumhomöostase) und 3. neurohumorale Regulationen (v.a. β -Adrenorezeptoren) [62]. Die Muskelkontraktion erfolgt durch eine verstärkte Überlagerung dünner und dicker Filamente, wobei die Länge beider Filamente konstant bleibt; ein aneinander vorbeigleitendes Wechselspiel der Myosin- und Aktin-Filamente findet statt („Gleitfilament“-Theorie) [62]. Die treibende Kraft der Kontraktion stellen die Myosin-Köpfe

dar, die so genannten Myosin-Querbrücken. Innerhalb der Myosin-Köpfe ist die ATPase lokalisiert, die die benötigte Energie für die Kontraktion liefert. Durch die Bindung des Aktins an das Myosin-Köpfchen, ändert sich dessen Konformation und die Abkopplung von Aktin kann erfolgen. Folglich findet eine erneute Konformationsänderung der Myosin-Köpfchen statt, sodass eine erneute Aktin-Bindung eintreten kann. Dieses Prinzip wiederholt sich zyklisch und der Muskel kontrahiert. Die Strukturänderungen des Myosin-Kopfes bildet die molekulare Grundlage des Querbrückenzyklus und je nach Stärke der Myozyten-Kontraktion wird demnach auch die Pumpleistung des Herzens bestimmt [63].

1.7 Die Proteine des kontraktilen Apparates

Im kontraktilen Apparat sind zwei Hauptproteine verankert. Das Aktin, welches die strukturgebende Komponente der dünnen Filamente darstellt und das Myosin, das entscheidende Protein der dicken Filamente. Neben diesen beiden Hauptproteinen spielen andere Proteine ebenfalls eine Rolle: die Regulatorproteine der dünnen Filamente (Tropomyosin und Troponinkomplexe) sind Aktin-assoziierte Proteine, die sich über 7 Aktinmoleküle erstrecken und das dünne Filament dementsprechend zusammen halten. Titin, ein Protein der dicken Filamente bildet das Gerüst der Myofibrillen und verbindet das Myosin mit der Z-Scheibe. Somit ist es ein wichtiger Bestandteil der Sarkomerbildung [60].

Die Hauptstrukturkomponente der dicken Filamente, das Myosin, ist ein Motorprotein, welches in diverse kinetische Prozesse involviert ist und folgende Eigenschaften aufweist: es ist ein Hexamer, ist asymmetrisch aufgebaut und besitzt einen 150nm langen, stabförmigen Schaft, das das dicke Filament charakterisiert. Am Ende des gestreckten Teils besitzt es zwei etwa 20nm große Köpfchen die während des Prozesses der Kontraktion an das Aktinmolekül binden. Wie oben bereits beschrieben, liegt hier das Zentrum der Energiebildung und somit die molekulare Grundlage zur Kontraktion. Jedes Myosinmolekül ist aus 6 Untereinheiten aufgebaut: zwei schwere Ketten (myosin heavy chain, MHC), die in alpha-helikaler Struktur den Schaft bilden, eine essentielle und eine regulatorische leichte Kette (myosin light chain, MLC), welche je nach Muskeltyp zur Aktivierung (glatte Muskel) oder zur Feinregulation der Kontraktion (quergestreifte Muskel) dienen und die Myosinköpfchen, mit denen die leichten Ketten assoziiert sind [60]. Mindestens 17 unterschiedliche Gene der Myosine werden in den Muskeln exprimiert, die auf unterschiedlichem Chromosom lokalisiert sind und die die Isoformen I-XVII bilden. Für die Säugetiere relevant sind die Isoformen der Klasse II, die sich wiederum in skeletale, kardiale sowie in glatte und nichtmuskuläre Myosine klassifizieren [64]. Bekannte kardiale Isoformen sind Myh7, Myh6, Mybc3, Myl2 und Myl3 [64].

Die strukturegebende Komponente der dünnen Filamente bildet das Aktin, welches im Ursprung ein globuläres Protein darstellt (G-Aktin). Unter physiologischen Bedingungen polymerisiert es zu langen, fadenförmigen Ketten (F-Aktin) [60]. Dem Myosin gleich liegen zwei F-Aktine in α -helikaler Form vor. Innerhalb der Doppelhelix-Struktur der Aktine schmiegt sich das Tropomyosin über 7 Aktinmoleküle an und nimmt, wie die Aktine, die Doppelhelix-Struktur an, wodurch es zu den Aktinmolekülen einen Kontakt aufbaut [65, 66]. In den quergestreiften Muskelzellen befindet sich an den Enden der Tropomyosine jeweils ein Troponin-Komplex. Dieser Komplex besitzt als primäre Funktion die Regulierung der Kontraktion, indem es die Tropomyosine am Aktin fixiert und je nach Konformationszustand die Bindungsfähigkeit für das Myosin variiert. Genauer gesagt, der Troponin-Komplex besteht aus 3 Untereinheiten: Troponin T (Tnnt2), die stabile Verbindung zu Aktin, Troponin I (Tnni2), die variable Verbindung zu Aktin und das calciumbindende Troponin (Tnnc1) [67]. Bindet Calcium an Tnnc1 erfolgt eine Konformationsveränderung und Aktin öffnet sich für das Myosin (ähnlich Schlüssel-Schloß-Prinzip) [67].

Außerhalb des Sarkomers bilden Proteine wie Desmin, Plectin, Synemin und Paranemin das Gerüst der Intermediärfilamente. Auch Mitochondrien, Zellkerne und sarkolemmale Teile werden über diese Proteine organisiert. Aus Dystrophin besteht das Membranzytoskelett der Muskelfasern und bildet eine Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix [60].

Myosin ist ein essentielles Protein für den Herzmuskel. Mutationen dieses Proteins können erhebliche Folgen haben. Wie in Kapitel 1.3 bereits beschrieben, zeigen genetische Dispositionen familiäre Erkrankungen hinsichtlich des Myokards. Bisher sind keine Daten publiziert, die Rückschlüsse der Myosin-Mutationen oder anderen Proteine des kontraktile Apparates auf eine Myokardhypertrophie aufweisen, aber dennoch sind Mutationen in den Sarkomer-Proteinen, wie Myh7, Myh6 und Mybpc3 hauptverantwortlich für die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie. 35-50% und somit der Hauptanteil aller hypertrophen Kardiomyopathie-Formen machen Mutationen in Myh7 aus [68-74]. SNPs innerhalb der Myosine können Herz-Kreislauf-Erkrankungen induzieren, vorallem wenn die SNPs innerhalb der Motordomäne lokalisiert sind. Die Funktion der Myosine ist dann in der Regel eingeschränkt [75].

Geschlechterunterschiede der Proteine im kontraktilem Apparat wurden bis dato nicht publiziert. Dennoch macht es Sinn, wenn die Stoffwechselwege der Sarkomerproteine geschlechtsspezifisch ablaufen. So zeigte die Arbeitsgruppe um Luckey und Kollegen, dass der Glykogen-Synthase-kinase-3 β (GSK3 β) Metabolismus in die Entwicklung der familiären Hypertrophie involviert ist. Es wurden Mäuse untersucht, die sowohl das mutante Myh7 als

auch das GSK3 β transgen exprimierten. Die Mäuse, die das GSK3 β im Herz produzierten, reduzierten das myokardiale Wachstum und blockierten infolgedessen die Entwicklung der Myokardhypertrophie. Dies bestätigte sich nur in den männlichen Mäusen, nicht in den Weiblichen [76]. Das Experiment zeigt, dass in der Proteinzusammensetzung des kontraktiven Apparates im Herzen zwar keine Geschlechterunterschiede bestehen dennoch die Funktion dieser Proteine durchaus vom männlichen oder weiblichen Organismus differieren kann. Generell enthalten Organe, wie auch das Herz, tausende von sowohl gewebsunspezifischen als auch geschlechtsunspezifischen Proteinen, die mit den gewebs- bzw. geschlechtsspezifischen Proteinen in Protein-Protein-Interaktion treten können.

1.8 Rolle des Myokardstoffwechsels bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Einen hohen Energieanteil benötigt das Herz, um bestimmte Abläufe, wie Ionentransport, Sarkomerfunktionen und Calcium-Homöostase aufrecht zu erhalten. Von Natur aus besitzt der Herzmuskel kaum eigene Speicherkapazitäten, so dass eine Verwendung jedes nutzbaren Substrattypen zur Energiegewinnung unausweichlich ist. Bei einer ausreichenden Sauerstoffversorgung erfolgt die Adenosin-Triphosphat ATP-Gewinnung bei gesunden adulten Herzen zu 60-90% aus langkettigen, nicht veresterten, freien Fettsäuren (FS) in der β -Oxidation. Nur 10-40% entspringen aus der Glucoseoxidation. In mehreren Teilschritten oxidiert sowohl die FS als auch die Glucose in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA. Dieses Endprodukt aus beiden Stoffwechselwegen gelangt in den Zitronensäurezyklus, wo schließlich die reduzierenden Äquivalenten Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) entstehen. Beide Äquivalenten transportieren Elektronen zur Elektronentransportkette, der oxidativen Phosphorylierung, in der die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat zu ATP über die Komplexe I bis V mit ihren Enzymen (NADH-Dehydrogenasen, Succinat-Dehydrogenasen, Cytochrom-c-Reduktasen, Cytochrom-c-Oxidasen und F₀F₁-ATPase) erfolgt. Die gewonnene Energie in Form von ATP wird von der mitochondrialen Matrix über einen Adenosin-Nukleotid-Transporter (ANT) ins Cytoplasma transportiert und schließlich für zelluläre Prozesse zur Verfügung gestellt [77-79]. Ist der Muskel mit Sauerstoff unterversorgt, tritt zur Energiegewinnung die anaerobe Glykolyse in Kraft. Glucose wird zu Laktat metabolisiert und ebenfalls über Acetyl-CoA in den Zitronensäurezyklus eingeschleust. Im fetalen Herzen ist aufgrund des limitierenden Sauerstoffgehaltes und der geringen Verfügbarkeit an freien Fettsäuren die anaerobe Glykolyse der wichtigste Bestandteil, um Energie zu gewinnen. Nach der Geburt, in der postnatalen Phase, steigt durch einen Anstieg an der kardialen Arbeit und des Sauerstoffes die mitochondriale Fettsäureoxidation an (Abbildung 6) [79-81].

Bei einer Myokardhypertrophie verläuft der kardiale Metabolismus anders als im gesunden Herzen. Im hypertrophierten Muskel findet je nach Art der mechanischen Belastung, der Sauerstoffversorgung und der ATP-Verfügung eine Stoffwechselveränderung statt. Die Genexpression der für die β -Oxidation beteiligten Enzyme nimmt ab, woraus die Angleichung der Energiegewinnung an den fetalen Metabolismus resultiert. Der Anteil an Energiegewinnung aus der β -Oxidation gleicht sich dementsprechend an den der Glykolyse an [82]. Wo vorher bis zu 90% Energie aus der Fettsäure-Oxidation gewonnen wurde, sind es im hypertrophierten Muskel nur noch 60%. 40% der Energie stammt demnach aus der Glykolyse. Bei dieser Substratverlagerung handelt es sich um einen adaptiven Mechanismus, der den fetalen Phänotypen reaktiviert und dadurch eine „programmierte“ Stressantwort gibt [83]. Die molekularen Mechanismen, die zu dieser Substratverschiebung führen sind bis heute noch unbekannt. Bekannt ist dennoch, dass die Expression nuklearer Gene, die mitochondriale Proteine kodieren, die Steuerung der Substratverschiebung durch spezifische, transkriptionelle und regulatorische Prozesse beeinflussen [83]. Der Herzmuskel ist im Stande, sich seiner Substratbedürfnisse anzugleichen.

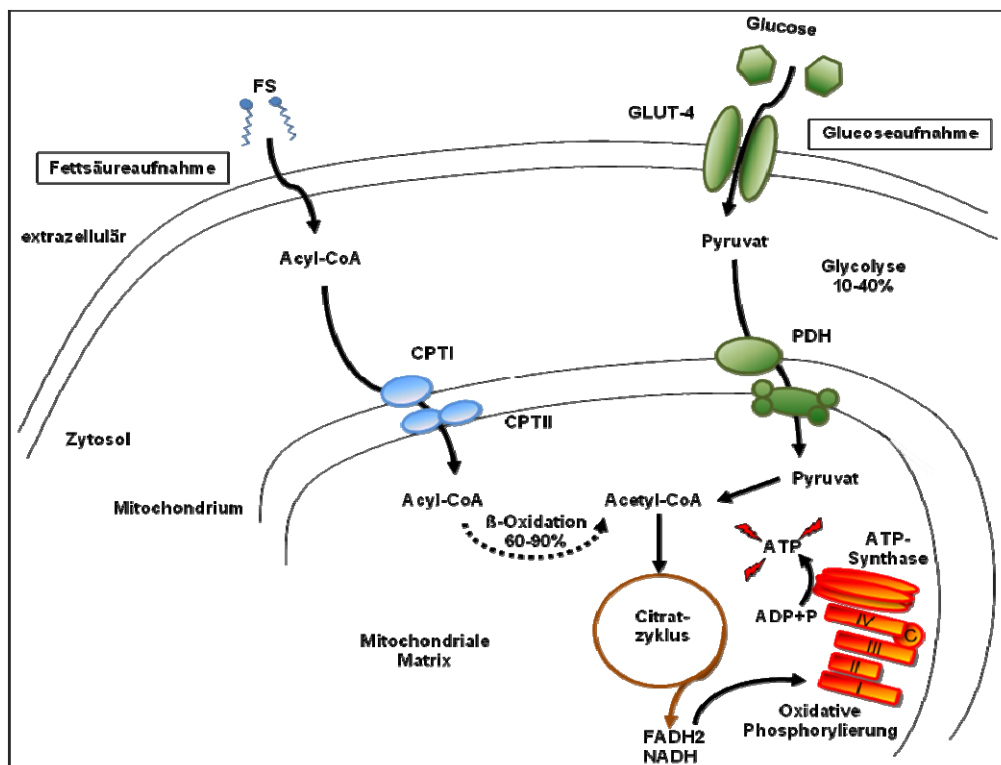


Abbildung 6: Kardialer Metabolismus. Die Energiegewinnung in Form von ATP des kardialen Stoffwechsels gelingt hauptsächlich durch β -Oxidation und Glykolyse. Fettsäuren (FS) und Glucose werden von der Zelle aufgenommen und über spezifische Enzyme verestert, verstoffwechselt und in die Mitochondrien transportiert, wo sie schließlich zu ATP metabolisiert werden. PDH: Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex; CPTI/II: Carnitoyl-Palmitoyl-Transferase I/II.

Grundsätzlich wird die kardiale mitochondriale Kapazität auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert [84]. Akute Veränderungen der ATP-Gewinnung werden durch Enzyme verursacht, die an den jeweiligen Reaktionen beteiligt sind. Im Gegensatz dazu finden chronische Veränderungen bereits auf transkriptioneller Ebene statt [84]. Die wichtigsten Regulatoren des kardialen Metabolismus bzw. des Fettsäure- und Glucose-Stoffwechsels sind die „peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPAR) mit ihren Isoformen: PPAR α (im kardialen Gewebe [85]), PPAR β/δ (in Kardiomyozyten [86]) und PPAR γ (hauptsächlich im Fettgewebe und Leber, zu geringen Teilen im Myokard [87]) [88, 89]. Neben der Aufgabe im Lipid- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel sind diese auch beteiligt am zellulären Wachstum, an der Wundheilung und an der Inflammation [90, 91]. Polymorphismen in den Genen von PPAR α und PPAR γ sind beim Menschen mit der Entwicklung einer linksventrikulären Myokardhypertrophie, einer Hypertonie, von Adipositas und mit Störungen im Lipidstoffwechsel assoziiert [92-95].

1.9 Geschlechtsspezifische Aspekte des Myokardstoffwechsels bei Myokardhypertrophie

Geschlechterunterschiede im kardialen Metabolismus sind bis dato nur wenig publiziert. Bekannt ist, dass bestimmte Schlüsselenzyme der Glykolyse und β -Oxidation durch Östrogene reguliert werden [96]. Bei Männern und Frauen verlaufen diese Entwicklungen daher unterschiedlich [97-100]. Bei PPAR α defizienten Mäusen ist die Fettsäureoxidation vermindert. Dies wirkt sich auf eine verstärkte Lipidakkumulation mit folgender Myokardhypertrophie aus. In besonders schwerwiegenden Fällen führt dieser Enzym-Defizit zum Tod. Bei diesem finalen Stadium zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede. Die Mortalitätsrate liegt bei den männlichen Mäusen bei 100%, bei weiblichen Tieren allerdings nur bei 25% [101, 102].

In einer geschlechtsspezifischen Altersstudie mit Affen konnte festgestellt werden, dass in linken Ventrikeln der alten männlichen Affen Schlüsselenzyme der Glykolyse (z.B. Pyruvat-Kinase, Alpha-Enolase), der Glucoseoxidation (Pyruvat-Dehydrogenase), des Zitronensäurezyklus (2-Oxoglutarat-Dehydrogenase) und der oxidativen Phosphorylierung (Komplex III-V) in ihrer Expression und Funktion im Vergleich zu weiblichen Affen reduziert vorlagen. Diese Herunterregulation führt zu einer geringeren Energieausbeute und gilt als möglicher Parameter eines erhöhten Risikos bei Männchen an kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken. In weiblichen Affen konnte dies nicht bestätigt werden. Yan und Mitarbeiter stellten diese Ergebnisse als mögliche Protektion für den weiblichen Organismus dar. Diese erleiden erst sehr viel später als Männer an einer kardiovaskulären Erkrankung.

Wodurch genau die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Proteinregulation entstehen, konnte bisher nicht analysiert werden [103].

1.10 Die Mausinzuchtstämme C57BL/6J und PWD/Ph

Die Labormaus ist ein Abkömmling der Hausmaus (*Mus musculus*) und stellt in der medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung eines der wichtigsten Versuchstiere dar. Als eines der kleinsten Säugetiere gilt sie als geeignet für die Erforschung humaner Erkrankungen, dessen Ergebnisse zum Teil auf den Menschen übertragbar sind. Desweiteren sind Mäuse in ihrer Haltung und im Handling wenig aufwendig und in ihrer schnellen Reproduktion gut für die Zucht genetischer Modelle geeignet.

Als Inzuchtstämme werden Mauslinien bezeichnet, die nach festgelegten Bestimmungen des „Committee On Standardized Genetic Nomenclature For Mice“ gezüchtet werden [104, 105]. Hierbei müssen mindestens 20 Generationen ausschließlich durch Bruder-Schwester-Paarungen erfolgen. Danach werden alle Generationen als genetisch homozygot betrachtet, auch wenn rechnerisch nur 98,7% als identisch vorliegen. Aufgrund extrachromosomaler Faktoren und Spontanmutationen, liegt eine 100%ige Homozygotie tatsächlich nie vor [106, 107].

Die parentalen Mauslinien, der in diesem Projekt benutzen Mäuse, stammen aus *M. m. domesticus* (C57BL/6J (B6)) und *M. m. musculus* (PWD/Ph (PWD)). Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die ersten B6-Tiere gezüchtet und zählen somit zu den ältesten Inzuchtstämmen der Welt. Ursprünglich sind sie durch Kreuzung von mehreren Wildstämmen entstanden. Die PWD Maus-Linien basieren auf neuerem Datum. 1972 begann die Zucht in der Tschechischen Republik und erlangten 1999 den SPF Status, wodurch die PWD-Maus für Forschungszwecke benutzt werden konnte [108]. Die Subspezies *M. m. musculus* und *M. m. domesticus* weichen 300 Tausend [109] bis 1 Million Jahre [110] von ihren ursprünglichen Ahnen ab. Als Konsequenz des unterbrochenen Genflusses dieser beiden Spezies, entwickelten die PWD-Mauslinien eine hohe Anzahl an DNA-Polymorphismen und einen phänotypischen Unterschied im Vergleich zu den klassischen Labormäusen [108, 111]. Die PWD erlangten somit eine immer größer werdende Bedeutung in der genetischen Erforschung wichtiger Erkrankungen, wie z.B. kardiovaskulärer Erkrankungen.

1.11 konsomische Mausstämme: Entstehung und Anwendung

Eine konsomische Maus (CS: von „Consomic strain“) ist eine Maus, die ein homologes Chromosom einer fremden Mauslinie besitzt. In diesem Projekt dienen als Akzeptor-Tiere die B6-Mäuse und als Donator die PWD-Mäuse. Durch reine Kreuzung geschieht ein Chromosomen-Transfer von der PWD-Maus in die B6, bis das austauschbare Chromosom als komplettes, homologes Chromosom vorliegt [112]. Der homologe Chromosomensatz einer Maus enthält 19 Chromosomen und X bzw. Y. Dementsprechend wurden 21 konsomische Mauslinien (CS1-19, CSX und CSY) erzeugt [112, 113]. Aufgrund einer schlechten Reproduktionsrate, geringer Fertilität, Sterilität und hohe Neugeborenen-Sterblichkeit innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt von CS10, CS11 und CSX können diese Chromosomen nicht im Ganzen ersetzt werden, sondern nur in mehreren Teilstücken. Folglich werden diese Chromosomen in proximal, mittel und distal geteilt und deren Teilstücke in den Akzeptor übertragen. Diese Tiere sind, bis auf Weiteres agil und fertil. Eine Ausnahme stellt der proximale Part von Chromosom 10 dar. Diese Mäuse sind mit einem überdimensionierten Fetus assoziiert, der zu einer hohen Sterblichkeit der Muttertiere während der Entbindung führt [114]. Warum diese Chromosomen Reproduktions-Schwierigkeiten haben, ist bis heute nicht geklärt.

Abbildung 7 zeigt die Entstehung konsomischer Linien. Üblicherweise dauert die Zucht einer Linie über 10 Generationen, gilt dann aber als stabil. Beginnend mit den parentalen Mauslinien, B6 und PWD, wird das Zielchromosom durch ein homologes Chromosom ausgetauscht. Zunächst findet eine Kreuzung der beiden Linien statt. Die entstehende F1-Generation wird mit der Empfänger-Linie rückgekreuzt, es entsteht N1. Mäuse dieser Generation werden mittels spezifischen Markern selektiert und mit B6-Mäusen nochmals 4- bis 8-mal gekreuzt bis eine Maus mit dem heterologen Zielchromosom entsteht. Um das homologe Zielchromosom zu erhalten, werden Geschwister verpaart. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % entsteht eine konsomische Maus, deren Zielchromosom durch ein homologes Chromosom einer anderen Maus getauscht wurde [113].

Das erste komplette Set der konsomischen Mauslinien wurde im Labor von Singer und Kollegen etabliert. Sie benutzten als Empfänger B6-Mäuse und als Spender A/J [115]. Diese gezüchteten Stämme werden heute für diverse genetische Analysen komplexer Eigenschaften, wie z.B. Angst [116], Pubertät [117] sowie *cis*- und *trans*-Regulationen von Transkripten in Niere und Leber benutzt [118]. Ein komplettes Set konsomischer Mäuse bietet die Möglichkeit interessante genetische Merkmale auf den Chromosomen zu identifizieren und zu lokalisieren (QTL). Eine Voraussetzung ist dabei, dass diese Merkmale zwischen den unterschiedlichen Stämmen differieren [119].

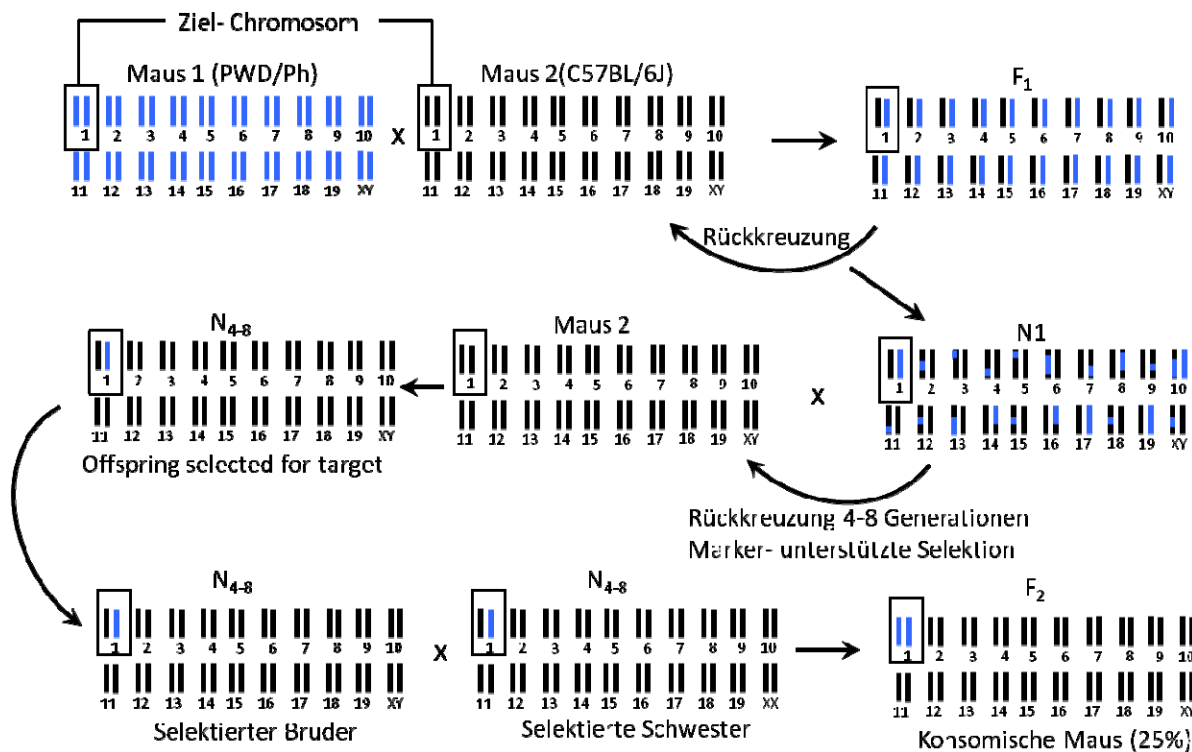


Abbildung 7: Entstehung konsomischer Mauslinien. Durch reine Kreuzungen entstehen in der F₂-Generation konsomische Linien. Hierzu werden die parental Stämme miteinander gekreuzt und die F₁-Generation mit dem Empfänger rückgekreuzt. Anhand einer Marker-unterstützten Selektion des Zielchromosoms findet eine weitere Rückkreuzung für 4-8 Generationen statt. Die Paarung der selektierten Geschwister erfolgt für die Entstehung stabiler, konsomischer Mäuse (modifiziert nach Cowley et al. 2004 [112])

Angewendet werden die konsomischen Mauslinien in folgenden Schwerpunkten:

1. *Partitionierung des Genoms*: die Spender-Chromosomen werden in dem Empfänger individuell aufgeteilt, so dass durch phänotypische und genotypische Unterschiede zwischen dem Empfänger und der konsomischen Linie auf die jeweilige chromosomale Lokalisation geschlossen werden kann [120].
2. *Dominanz-Test*: ein Vergleich zwischen homogenen konsomischen Mauslinien und heterogenen F₁-Hybriden erlaubt eine direkte Prüfung der Dominanz im Phänotypen [120].
3. *Detektieren von QTLs*: ein Vergleich der konsomischen Mauslinie mit dem Empfänger-Stamm erlaubt eine phänotypische Identifizierung von quantitativen Merkmalen auf den jeweiligen Chromosomen. „Phänotypische Störungen“ werden durch diesen Vergleich weitestgehend ausgeschaltet [120, 121].
4. *Überprüfung genetischer Interaktionen*: ein Phänotyp ist nicht immer nur mono-chromosomal beeinflusst, sondern kann auch multi-chromosomal abhängig sein. Es

wäre schwierig und sehr aufwendig mehrere konsomische Mauslinien zu züchten, die mehr als ein konsomisches Chromosom besitzen, so dass hierbei vom gegenteiligen Verfahren ausgegangen wird. Die Abstinenz von dem jeweiligen Phänotyp, zeigt an, welche Chromosomen eine entscheidende Rolle in der Ausprägung des zu untersuchenden Merkmales spielt [120].

5. *Vererbung genetischer Merkmale*: jedes Genom unterschiedlicher Maus-Spezies besitzt einen gewissen Anteil an Polymorphismen, d.h. Mutationen, die sich in der Evolution zu unterschiedlichen Allelen eines Gens etabliert haben. Diese Polymorphismen können unter Umständen einen anderen Phänotyp hervorrufen. Mit Hilfe von konsomischen Mauslinien können diese Vererbungen genetischer Variabilitäten entschlüsselt werden [122].

1.12 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Methoden der Proteom-Analysen (hochauflösende, zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie) untersucht werden

1. ob und in welchem Ausmaß sich das Herzproteom von verschiedenen konsomischen Mauslinien in der Expression einzelner Proteine unterscheidet. Es werden dabei einzelne CS-Linien mit B6 verglichen. Unterschiede in der Expression einzelner Proteine sind damit Ausdruck von Polymorphismen.
2. sollte die Expression der Proteine zwischen Männchen und Weibchen verglichen werden und zwar innerhalb verschiedener CS. Damit werden geschlechtsspezifisch exprimierte Proteine erkannt. Wenn gleiche geschlechtsspezifisch exprimierte Proteine in verschiedenen CS unterschiedlich synthetisiert werden, wäre das ein Hinweis auf die genetische Beeinflussung der Geschlechtsspezifität der Proteine.
3. sollte Herzhypertrophie in verschiedenen CS und in Männchen und Weibchen induziert werden. Das Ergebnis sollte zeigen, ob die Krankheit in ihrem Schweregrad und im zeitlichen Auftreten von dem jeweils in einem CS vorliegendem Set an polymorphen Genen/Proteinen und darüberhinaus vom Geschlecht abhängt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Im Folgenden sind alle verwendeten Materialien alphabetisch aufgelistet

2.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Geräte und Zubehör

Gerät / Zubehör	Typenbezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Memmert	Karl Falk (Berlin, Germany)
Elektrophoresekammer (IEF)	Elektrophoresekammer	Wita GmbH (Berlin, Deutschland)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Elektrophoresekammer	DESAGA GmbH (Wiesloch, Deutschland)
ESI-Massenspektrometer	LCQ Deca Ion Trap	Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, USA)
Feinwaage	BP301S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Glasplatten	Glasplatten (40x30 cm)	Berlin Glas OHG (Berlin, Deutschland)
Hamilton-Spritzen	Hamilton-Spritzen, verschiedene Größen	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
Kühlzentrifuge	Varifuge 3,0R	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold, Deutschland)
MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer	Autoflex III smartbeam	Bruker-Daltonik (Bremen, Deutschland)
Mörser	Mörser	Wita GmbH (Berlin, Deutschland)
Photometer	Ultrospec® 3100	Amersham pharmacia biotech (Nümbrecht, Deutschland)
Spannungsgerät	EPS 3500XL	GE Healthcare (München, Deutschland)
Tischzentrifuge	Micro-Centrifuge 2	neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK 31	Bandelin electronic GmbH & Co. (Berlin, Deutschland)
Vortexer	Julabo Paramix	Juchheim Labortechnik (Seelbach, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Typenbezeichnung			Hersteller
Benzonase	Benzonase			Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glaskugeln	Durchmesser 0,05mm	2,5mm	+/-	Worf Glaskugeln GmbH (Mainz, Deutschland)
Ionenaustauscher	Amberlite® IRN-150			Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Multi-Chem™-Platte	Microplate Devices Uniplate®			Whatman Inc. Corporation (NJ, USA)
Noppenmatte	Capomats Silicone R	96 Wells	Round	Whatman Inc. Corporation (NJ, USA)
Nylonfaden	Angelschnur (Durchmesser: 0,7mm)			Ertner; Deutschland
Pepstatin A	Pepstatin A			Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Phosphatase Inhibitor Cocktail	PhosSTOP, Tabletten			Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Plastikküvetten	Plastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)			Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail	Complete Protease Inhibitor, Tabletten			Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Reinigungslösung für Gelröhrchen	Deconex® -12-Lösung			Borer Chemie (Zuchwil, Schweiz)
Roti® Nanoquant Lösung	Roti® Nanoquant Lösung			Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
Silikonfett	Baysilone Paste			Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
Target	MTP AnchorChips®			Bruker-Daltonik (Bremen, Deutschland)
Vial	Gewindeflasche (Gewinde = 8mm)	aus	Glas	CS Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, Deutschland)
ZipTip	ZipTip®			Millipore Corporation (MA, USA)

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie (Abkürzung)	Chemikalie	Hersteller
ABC	Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Agarose	Agarose	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Acetat	Natriumacetat	Merck KGaA (Darmstadt, deutschland)
Aceton	Aceton	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid	Acrylamid 99,9%	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Acrylamid (SDS-PAGE)	4 x Acrylamid (Sonderabfüllung)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ammoniumphosphat	Ammoniumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Ampholin	Ampholinmix (pH 3,5-10)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Ampholyt	Pharmalyte (pH4-6,5)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Ampholyt	Pharmalyte (pH5-8,0)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Azetonitril	Azetonitril	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Bis-Acrylamid	N,N-Methylbisyacrylamid 2x (Sonderabfüllung)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Bromphenolblau	Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Carbonat	Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfat	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
DTT	Dithiothreitol	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Essigsäure	Essigsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Ethanol	Herbeta-Arzneimittel (Berlin, Deutschland)
Ethylendiamin	Ethylendiamin	Merck KGaA (Darmstadt,

		Deutschland)
Formalin	Formaldehydlösung, 37%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glutaraldehyd	Glutaraldehydlösung, 25%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Glyzerin; 87%, wasserfrei	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Glycin	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Harnstoff	Harnstoff, hochrein	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Harnstoff (für Laufpuffer)	Harnstoff	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
HCCA	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure	Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Magnesiumchlorid-6-hydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Methanol	Merck KDGA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Persulfat (APS)	Ammoniumpersulfat	Biorad (Hercules, CA, USA)
Phosphorsäure	Ortho-Phosphorsäure, 85%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Natriumdodecylsulfat	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Sephadex	Sephadex G-200	GE Healthcare (München, Deutschland)
Servalyt 2-4	Servalyt (pH 2-4)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Servalyt 2-11	Servalyt (pH 2-11)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Servalyt 6-9	Servalyt (pH 6-9)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Silbernitrat	Silbernitrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
TFA	Trifluoressigsäure	Merck KGaA (Darmstadt,

Thimerosal	Thimerosal [®]	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Thioharnstoff	Thioharnstoff	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Thiosulfat	Natriumthiosulfat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Tris Base	Trizma [®] Base	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Tris-HCl	Trometamol-Hydrochlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Tritriplex	Tritriplex 3	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin	Trypsin	Promega (Madison, WI, USA)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Agarose	0,3% Tris Base; 1,44% Glycin; 0,1% SDS; 1% Agarose (frisch dazu geben); in bidestilliertem H ₂ O
Ampholinmix	1 Teil Ampholin (pH3,5-10), 1 Teil Servalyt (pH2-11); 1 Teil Servalyt (pH6-9); 3 Teile Ampholyt (pH4-6,5); 2 Teile (pH5-8)
Anodenpuffer (für die IEF)	3 M Harnstoff; 0,742 M Phosphorsäure; in bidestilliertem H ₂ O
Capgellösung (für die IEF)	12% Acrylamid (w/v); 0,13% PDA (w/v), 4% Carrier Ampholyt Mix (v/v); 9 M Harnstoff; 5% Glycerin (w/v); 0,06% TEMED (v/v); 0,03% Persulfat (w/v, Frisch zugesetzt); in bidestilliertem H ₂ O
Entwicklerlösung	2,5% Na-Carbonat (w/v), 0,01% Formalin (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Fixierlösung	50% Ethanol, 10% Essigsäure (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Gellösung (für die SDS-PAGE)	15% Acrylamid (w/v); 0,2% Bisacrylamid (w/v); 0,03% TEMED (v/v), 0,1% SDS (w/v); 375 mM Tris Base; 125 mM Tris-HCl; 0,08% Persulfat (frisch dazugeben); in bidestilliertem H ₂ O
Inkubationslösung	0,5 M Na-Acetat; 0,1% Na-Thiosulfat (w/v); 30% Ethanol (v/v); 0,5% Glutaraldehyd (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Kathodenpuffer (für die IEF)	0,749 M Ethylendiamin; 3 M Harnstoff; 5% Glycerin (w/v); in bidestilliertem H ₂ O
Laufpuffer (für die SDS-PAGE)	0,3% Tris Base (w/v); 1,44% Glycin; 0,1% SDS
Magnesiumlösung	5 mM Magnesiumchlorid-6-hydrat in Probenpuffer

Matrixlösung	0,1% HCCA in (1:1 Azetonitril / TFA) (v/v)
Phosphataseinhibitor-lösung	1 Tablette PhosStop in 1 ml bidestilliertem H ₂ O
Physiologische Kochsalzlösung	0,9% NaCl (w/v) in bidestilliertem H ₂ O
Probenpuffer	0,05 M Tris-Base; 0,05 M KCl; 20% Glycerin (v/v), 6,5% CHAPS (w/v; Frisch zugesetzt); in bidestilliertem H ₂ O
Proteaseinhibitorlösung (H1)	1 Tablette Complete in 2 ml bidestilliertem H ₂ O
Proteaseinhibitorlösung (H2)	1,5 mM Pepstatin A (w/v) in Ethanol
Proteaselösung	0,05 µg Trypsin in 1 ml bidestilliertem H ₂ O
Schutzlösung (für die IEF)	5 M Harnstoff; 5% Glycerin (v/v); 2% Servalyt 2-4 (v/v); in bidestilliertem H ₂ O
Schutzlösung (für die SDS)	375 mM Tris Base; 375 mM Tris HCl; 0,1% SDS in bidestilliertem H ₂ O
Sephadexlösung	12,5% Sephadex (für fünf Stunden bei 90°C in bidestilliertem H ₂ O aufquellen); 9 M Harnstoff; 70 mM DTT; 2% Ampholinmix (w/v); Harnstoff, DTT und Ampholinmix frisch zugeben
Servalytlösung	10% Servalyt 2-4 (v/v); 6 M Harnstoff; in bidestilliertem H ₂ O
Silberlösung	0,1% Silbernitrat (w/v); 0,01% Formalin (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Spüllösung	2,5% Natriumcarbonat in bidestilliertem H ₂ O
Stopplösung	0,05 M Tritriplex; 0,02% Thimerosal (w/v); in bidestilliertem H ₂ O
Trenngellösung (für die IEF)	3,5% Acrylamid (w/v); 0,3% PDA (w/v); 4% Carrier Ampholyt Mix (v/v); 9 M Harnstoff; 5% Glycerin (w/v); 0,06% TEMED (v/v); 0,03% Persulfat (w/v Frisch zugesetzt); in bidestilliertem H ₂ O
Verdünerlösung	5,4 g Harnstoff; 0,5ml DTT; 0,5ml Servalyt 2-4 in 5ml bidestilliertem Wasser
Verdaupuffer	10 mM NH ₄ HCO ₃ in bidestilliertem H ₂ O
Verdaupuffer (modifiziert)	10 mM NH ₄ NCO ₃ / Azetonitril (1:1)
Waschpuffer	20 mM Tris-Base; 0,9% NaCl (w/v); 0,1% TWEEN20 (v/v); in bidestilliertem H ₂ O; pH7,5

2.1.5 OP-Zubehör

Tabelle 5: OP- Zubehör

Substanz / Material / Gerät	Firma
Binocular	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Injektionsspritze (1 ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Isofluran	Boehringer Ingelheim (Deutschland)
Kanülen (0,45 x 12 mm)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Ketamin/Xylazin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Mersilene (2.0)	Ethicon (Norderstedt, Deutschland)
NaCl (0,9%)	Heiland (Hamburg, Deutschland)
Perma Hand Seide (6.0)	Ethicon (Norderstedt, Deutschland)
Pinzetten, Augenschere, Haken, Nadelhalter	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Rimadyl	Pfizer (Karlsruhe, Deutschland)
Rotlicht	Petra (Burgau, Deutschland)
Seidenfaden (6.0)	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Venenverweilkatheter (22G)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Ventilationsmaschine (Mouse Mini Vent)	Hugo Sachs Elektronik (Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Gewebepräparationen

Alle Arbeiten mit Versuchstieren wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Weibliche und männliche, 11 Wochen alte B6, PWD, F1-Generation (B6*PWD) (F1) und konsomische Mäuse der Linien CS5, CS12, CS14, CS16 und CS19 stammten aus der Zucht des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik (Berlin, Deutschland). Hierbei diente B6 als genetischer Hintergrund und PWD als Donator. Die Präparation erfolgte pro Gruppe an jeweils sechs Herzen unterschiedlicher Individuen. Hierfür wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet, der Thorax geöffnet, das Organ entnommen, in physiologischer Kochsalzlösung entblutet und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung fand die Lagerung der Organe bei -80°C statt.

2.2.2 Proteinextraktion

Ziel der Proteinextraktion ist es, die Proteine im Organ in Lösung zu bringen und zu isolieren, dabei ihren zelleigenen Abbau aber zu verhindern. Um die Zellstruktur der gefrorenen Organe zu zerstören, wurden sie zunächst in einen Möser überführt, der sich zur Hälfte in flüssigem Stickstoff in einer Styroporbox befand. Vor der mechanischen Zerkleinerung der Proben mit einem Stößel, erfolgte die Zugabe des Probenpuffers und der Proteaseinhibitorlösung (H1) (die genau eingesetzten Mengen sind in Tabelle 6 aufgelistet). Der Probenpuffer enthielt CHAPS, ein Detergenz, um die Proteine leichter in Lösung zu bringen und Proteaseinhibitorlösung, welche einen Proteinabbau durch zelleigene Enzyme verhinderte. Anschließend konnte das fein gemahlene Pulver in ein abgewogenes Eppendorfgefäß überführt und eine nach dem Gewicht der pulverförmigen Probe berechnete Menge an Glaskugeln und Proteaseinhibitorlösung (H2) (Tabelle 6) zugegeben werden. Um die Membranstruktur, insbesondere die der Nuklei aufzubrechen, fand eine Ultraschall-Behandlung der Probe statt. Nach einer Ultraschall-Behandlung von insgesamt 12 Intervallen für jeweils 20 Sekunden, erfolgte nach jedem Intervall für 20 Sekunden das Rühren der Proben auf Eis mit einem Platindraht, um eine zu große Erhitzung durch die Behandlung zu vermeiden. Nach weiteren 80 Sekunden Inkubationszeit auf Eis wurden die Glaskugeln durch Abzentrifugieren bei 3500 Umdrehungen für ca. eine Minute bei 4°C entfernt. Um DNA-gebundene Proteine zu lösen, wurde Magnesiumlösung und Benzonase (Tabelle 6) in die Proben pipettiert und anschließend für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe des chaotropen Agens Harnstoff und Thioharnstoff (Tabelle 6) und anschließender

Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 30 min lösten sich die zellulären Proteine. Es entstand eine klare, rot-braune homogene Lösung, die bei -80°C gelagert wurde.

Tabelle 6: Probenaufarbeitung

Puffer/Lösung/Chemikalie	Eingesetzte Menge
Probenpuffer (P)	Gewebeprobe (G) in mg x 1,6
Proteaseinhibitorlösung (H1)	$\sum_1 (G+P) \times 0,08$
Proteaseinhibitorlösung (H2)	$\sum_1 \times 0,02$
Glaskugeln	$\sum_2 (\sum_1 + H1 + H2) \times 0,034$
Magnesiumlösung (M)	$\sum_2 \times 0,021$
Benzonase (B)	$\sum_2 \times 0,025$
Harnstoff	$\sum_3 (\sum_2 + M + B) \times 0,78$
Thioharnstoff	$\sum_3 \times 0,3$

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte wurde mittels Roti-Nanoquant[®] nach Angaben des Herstellers ermittelt. Hierzu fand zunächst die Erstellung einer BSA-Standard-Reihe zur Kalibrierung statt (BSA-Konzentrationen von 0, 3, 5, 7, 10, 20 und 40ng/μl). Der BSA-Standardlösung (BSA-Konzentration: 2μg/μl) wurde Harnstoff (6,5M) und Thioharnstoff (2M) zugesetzt, um Standard und Probe anzugleichen. Die Proteinextrakte wurden 1:1000 mit bidestilliertem Wasser verdünnt, jeweils 300μl der Standardlösung bzw. der Probe mit 1,2ml Roti-Nanoquant[®] Arbeitslösung (1:4 Stammlösung: bidestilliertem Wasser) versetzt und für 5 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Überführung der Lösungen in Plastikkuvetten und deren Absorptions-Messung mit Hilfe eines Mikrospektrometers bei den Wellenlängen 450nm und 590nm. Um genauere Ergebnisse zu bekommen, fand eine Doppelbestimmung der Standardreihe sowie der Proben statt, woraus sich deren Mittelwerte für beide Wellenlängen errechneten. Aus den Mittelwerten ermittelte sich die Ratio. Anhand der gemessenen Werte der BSA-Standardreihe konnte eine Kalibrierungsgerade erstellt und mit Hilfe deren Steigung und der gemessenen Werte der Proben, die Proteinkonzentration errechnet werden.

2.2.4 Großgel 2D-Elektrophorese

1975 entwickelte und optimierte Prof. Dr. Dr. Joachim Klose die hochauflösende zweidimensionale Großgel-Elektrophorese (2-DE) Technik, welche bereits an anderer Stelle detailliert beschrieben wurde [123, 124]. Diese Technik erlaubt eine Auftrennung der Proteine aus einem Extrakt. Sie ist hochreproduzierbar und Gel-zu-Gel-Variationen sind auf ein Minimum beschränkt. In der Vergangenheit konnten bereits 10.000 so genannte „Proteinspots“ auf einem durch eine Silberfärbung visualisiertem Proteinmuster bei einem Testisextrakt unterschieden werden. Diese Anzahl ist allerdings nur manuell zu erreichen. Eine Software-unterstützte Auswertung der Muster erfasst weitaus weniger Spots.

Prinzipiell findet hierbei eine Verknüpfung zweier Elektrophorese-Techniken statt: die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit folgender SDS-PAGE. In der ersten Dimension, der IEF, erfolgt die Auftrennung der Proteine in einem stabilen pH-Gradient nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Das Beimischen von Ampholinen (Zwitterionen) erzeugt im IEF-Gel einen stabilen pH-Gradienten. Gemäß ihrer Ladung wandern die Proteine vom Punkt des Probenauftrags in Richtung Katode, bis sie an einem pH-Wert ankommen, bei dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Somit unterbleibt eine weitere Wanderung im elektrischen Feld. Dieser Wert entspricht dem isoelektrischen Punkt (pI) (Abbildung 8A).

Nach der Fokussierung erfolgt die zweite Dimension mit Hilfe einer SDS-PAGE, welche die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. Das SDS lagert sich an die hydrophoben Regionen des Proteins an, wodurch das Protein eine negative Ladung enthält, die die Eigenladung des Proteins überlagert und zur gleichen Zeit die unterschiedlichen 3D-Molekülstrukturen der Proteine durch Trennung von Wasserstoffbrückenbindungen auflöst. DTT reduziert hierbei die zwischen Cysteinen gebildeten Disulfidbrückenbindungen.

Als Ergebnis enthält man 2-DE aufgetrennte Proteine, deren pI von links nach rechts steigt und deren Molekulargewicht von unten nach oben zunimmt (Abbildung 8B).

Anzumerken ist, dass alle eingesetzten Gellösungen von der wissenschaftlichen Assistentin Frau Yvonne Kläre angesetzt, aliquotiert, bei -80°C eingefroren und gelagert wurden. Um unvernetzte Acrylamid-Monomere zu entfernen, erfolgte zuvor eine Behandlung der Gellösungen für eine Stunde mit einem Ionenaustauscher (18g/l). Jeder Gellösungsansatz wurde durch ein 2-DE-aufgetrenntes Standardprotein geprüft und mit Standardmustern der vergangenen Ansätze verglichen. Dies diente der Optimierung der Reproduzierbarkeit.

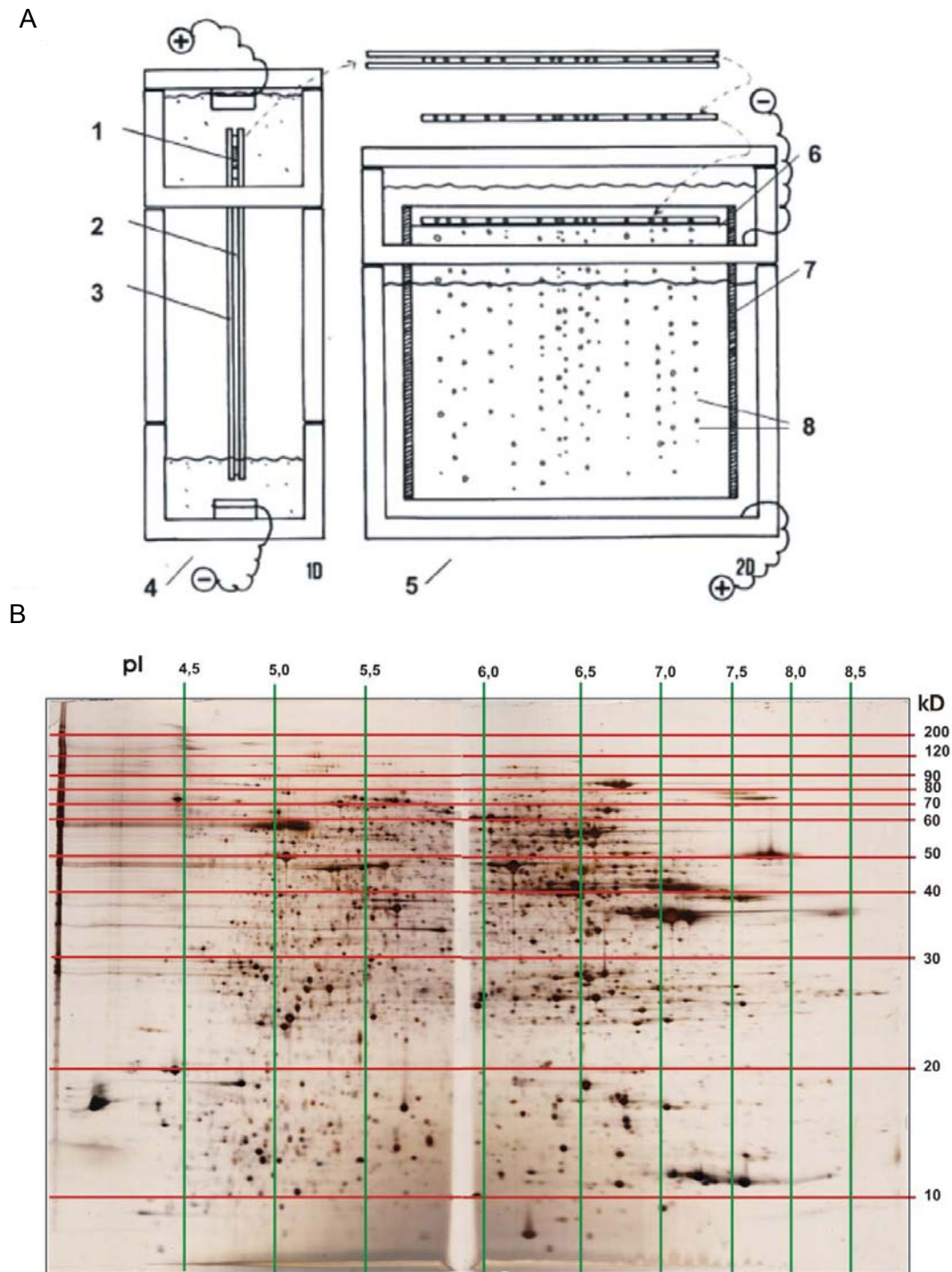


Abbildung 8: Zweidimensionale Gelelektrophorese. Schematischer Aufbau der Apparatur (A) der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Die Probe (1) wird auf das IEF-Gel aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgt daraufhin nach ihrem pI im Trenngel (2), welches sich im Glasröhrchen (3) befindet. Die Proteine laufen von Anode zur Katode (4). Nach dem Lauf findet der Transfer des IEF-Gels auf das SDS-Gel (6) statt, welches die Proteine nach ihrem Molekulargewicht trennt (8). Das Silbergel (B) zeigt die aufgetrennten Proteinspots. Von links nach rechts steigt der isoelektrische Punkt (pI) und von oben nach unten sinkt das Molekulargewicht (MW).

2.2.5 Die erste Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Herstellung der IEF-Gele verlief in zylindrischen Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1,5mm und einer Länge von 44,8cm. Vor dem Gießen des Gels, erfolgte eine sorgfältige Reinigung der Innenseite der Glasröhrchen in einer 50°C heißen Reinigungslösung (Deconex®, Borer Chemie, Schweiz), um eine gleichmäßige Anhaftung des Gels an die Innenwand zu gewährleisten und eine Kontamination mit Fremdproteinen zu vermeiden.

Nach Zugabe von 0,03%igem Ammoniumpersulfat (APS) in die aufgetaute Separationsgellösung (3,5%ige Acrylamid-Lösung) und 0,03%igem APS in das Cap-Gel konnte das Gießen der Gele erfolgen. Das Cappel besitzt eine 12%ige Acrylamidkonzentration und dient dem Auffangen der Proteine. Die Lagerung der Gele erfolgte bis zum Gebrauch bei RT. Die Länge der Gele betrug nach dem Gießen genau 40cm.

Tabelle 7: IEF-Lauf

Schritt	Programm (Großgeltechnik, 40 cm lang; Ø 1,5 mm)
1	100 V, 1 h
2	300 V, 1h
3	1000 V, 23h
4	1500 V, 30 min
5	2000 V, 10 min

Für den IEF-Lauf erfolgte die Einspannung von 4 bis 6 Gelröhrchen, mit der Cap-Gel-Seite unten. Die aufgetauten Proben wurden mit 70 mM DTT und einer Servalytlösung (eingesetzte Menge in μl = 0,1xGewicht in mg) versetzt und mit einer Proteinkonzentration von 30 μg auf eine 3mm dicke Sephadex-Schicht aufgetragen, um ein Verstopfen des Gelanfangs zu vermeiden. Sephadex diente zum Auffangen der Proteine, die zu Beginn der IEF, also einem Zeitpunkt, an dem sich die Proteine in hoher Konzentration am Gelanfang befanden, präzipitierten oder aggregierten. Um später die IEF-Gele auf die zweite Dimension auftragen zu können, war es notwendig, das Gel in der Mitte zu teilen. Eine Synchronität der Teilung war durch Anwendung eines pI-Markers (pI bei 6,4) gegeben. Eine 5mm dicke Schutzlösung-Schicht schützt die Proben vor einer Präzipitation bei Kontakt mit dem sauren Anodenpuffer (Phosphorsäurepuffer). Der Lauf erfolgt von Elektrode

(Phosphorsäure) in Richtung Kathode (Ethylendiamin) nach einem festgelegtem Programm (Tabelle 7).

Nach Beendigung der Gelläufe erfolgte die Inkubation (Umpuffern der IEF-Gele auf das SDS-System) in einer SDS-haltigen Lösung über Nacht bei -80°C . SDS diente dazu, den proteinassoziierten Harnstoff zu ersetzen.

2.2.6 Die zweite Dimension: SDS-PAGE

Bevor das Gießen der SDS-Gele erfolgen konnte, mussten die Glasplatten gründlich gereinigt werden. Eine hohe Sauberkeit war hier notwendig, da jede anhaftende Partikel ein Verschmieren der an dieser Stelle im Gel aufgetrennten Proteinprobe verursacht hätte.

Nach Zugabe von 0,08%igem APS in die aufgetaute 12%ige Acrylamid-Gellösung wurden die Gele luftblasenfrei gegossen. Um eine Aussparung für das Auftragen des IEF-Gels zu erlangen, wurden von unten zwei Millimeter Unterschichtungslösung (80% Glycerin) zwischen die Glasplatten gespritzt. Nach 1,5 Stunden waren die SDS-Gele vollständig auspolimerisiert. Um die Gele über Nacht bei 4°C bis zu ihrer Verwendung zu lagern, war eine luftdichte Verschließung dieser mit Parafilm® notwendig.

Die aufgetauten IEF-Gele wurden von Pufferresten befreit und vorsichtig von der Auftragsschiene luftblasenfrei auf das SDS-Gel aufgelegt. Um ein Ablösen des IEF-Gels vom SDS-Gel zu vermeiden, erfolgte das Auftragen einer erhitzten Agaroselösung über das IEF-Gel im Auftragsspalt. Die Agarose enthielt Bromphenolblau, welches während des Laufs eine blau gefärbte Lauffront bildete, die den Fortschritt des Elektrophorese-Laufs anzeigte. Die Gele wurden in die Laufkammer überführt und die Kammern mit den jeweiligen Puffern gefüllt. Die Laufkammer war mit einer Umwälzpumpe und einer Kühlspirale ausgestattet, um eine konstante Temperatur von 14°C zu gewährleisten. Der elektrophoretische Lauf begann zunächst bei einer Spannung von 70mA für 15 Minuten, gefolgt von einer Spannung von 100mA bis zum Ende des Laufs, nach ca. 5 Stunden. Generell liefen immer 2 Gele (Kontrolle und Probe) in einer Kammer, um mögliche Laufunterschiede zu minimieren.

Nach Beendigung des SDS-Laufs wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten gelöst und in einer Fixierlösung über Nacht bei RT für die Silberfärbung vorbereitet.

2.2.7 Silberfärbung von 2D-Gelen

Eine bereits an anderer Stelle beschriebene Silberfärbung [123, 125] wurde angewendet, um Proteinspots auf dem Gel zu visualisieren. Hier kamen zwei Methoden zum Einsatz: zum

einen die quantitative Färbung, die möglichst viele Proteinspots visualisierte, zum anderen die MS-Färbung, die einer Oberflächenfärbung entsprach, um später die Proteinspots aus dem Gel zu „picken“ und mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren. Dies war möglich, da Glutaraldehyd, die eine Quervernetzung der Proteine bewirkte, nicht zum Einsatz kam.

Um störende Rückstände von SDS oder Glycin zu entfernen, erfolgte als primärer Schritt der Färbung die Fixierung der Gele über Nacht bei RT, worauf sich eine zweistündige Inkubation auf dem Schüttler anschloss. Auf die Inkubation folgte ein zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für jeweils 20 Minuten sowie eine 30-minütige Behandlung in der Silbernitratlösung. Nach Absaugen letzter genannter Lösung wurden die Gele für einige Sekunden in bidestilliertem Wasser geschwenkt und daraufhin für eine Minute in der Spüllösung. Die Entwicklung der Gele, verglichen mit einer Silbergelvorlage als Standard, dauerte ca. 6 min. Einer 20-minütigen Inkubation in Stopplösung, folgte eine Waschung in bidestilliertem Wasser und einer finalen Trocknung bei 80°C.

Die MS-Färbung wich in einigen Punkten von der quantitativen Silberfärbung ab. Nach der Fixierung wurden die Gele zunächst für 10 Minuten in einer Ethanollösung (30% Ethanol in bidestilliertem Wasser) und anschließend in einer Thiosulfatlösung (0,02% Na-Thiosulfat (w/v) in bidestilliertem Wasser) inkubiert. Nach einer zweimaligen Waschung in bidestilliertem Wasser für jeweils eine Minute folgte eine 60-minütige Inkubation in der Silbernitratlösung. Die hier verwendete Silbernitratlösung beinhaltete kein Formalin und enthielt eine 0,15%ige Silbernitratkonzentration. Danach wurden die Gele wie oben beschrieben gewässert, gespült, entwickelt und in der Stopplösung der Färbeprozess beendet. Die Zusammensetzung der Entwickler- sowie der Stopplösung unterschied sich vom normalen Rezept. Die Entwicklerlösung enthielt zusätzlich 0,02% Natriumhydrogencarbonat und 0,025% Thimerosal. Nach dem Stoppvorgang fand die Waschung der Gele in bidestilliertem Wasser statt, woraufhin die Gele ohne jegliche Fremdpartikel in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert wurden.

2.2.8 Auswertung der Proteinmuster

Die Auswertung der digitalisierten Proteinmuster erfolgte mit Hilfe der Software *Delta2D* (Version 3.6, [126]).

Bildlich gesehen, erfolgte die Auswertung so, dass zunächst alle Spotmuster in eine Matrix integriert und anhand dieser Matrix nach und nach die Spots virtuell zur Deckung gebracht wurden, indem immer zwei Muster übereinander projiziert und dann global und lokal so lang

gestreckt oder gestaucht wurden, bis sie 1:1 übereinander passten. Dieser Prozess, das so genannte Matching, erfolgte durch das Setzen von mehreren hundert Vektoren, den Matchvektoren. Auf diese Weise fand schließlich die Deckung aller Spotmuster aus einem Projekt statt. Danach erfolgte die Spotdetektion. Hierbei errechnete die Software Umrisse zu allen auf einem Spotmuster erkennbaren Proteinspots. Nach einer manuellen Korrektur dieser Umrisse, fand die Projektion der Umrisse aller detektierten Spots auf jegliche Spots innerhalb eines Projektespotmusters statt (Abbildung 9). Anhand dieser digitalen Projektion erstellte das Programm eine Liste aller kalkulierten Spotvolumen (Grundfläche x Intensität = Volumen) pro Spot auf den verschiedenen Spotmustern, welche später der statistischen Auswertung diente (siehe Kapitel 2.2.17).

Um auf den MS-Gelen die Lage der quantitativ veränderten Spots eindeutig lokalisieren zu können, wurden diese ebenfalls eingescannt und die Spotumrandungen auf diese übertragen. Dieser Ablauf gab die Sicherheit, die richtigen Spots zu „picken“ und zu identifizieren.

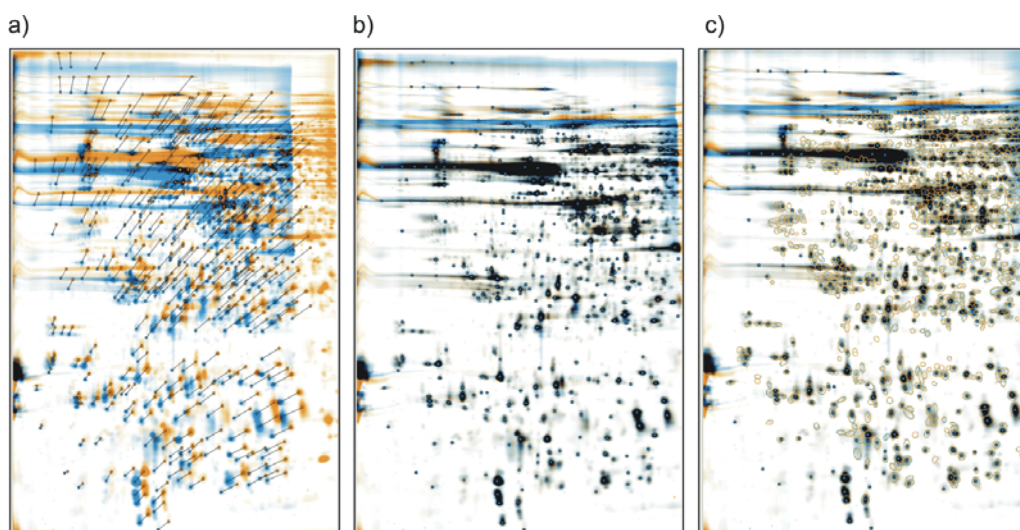


Abbildung 9: Auswertung mit Delta2D (Decodon). Diese computerunterstützte quantitative Auswertung der einzelnen Proteinspots erfolgt über a) das Matchen der Gele über die Proteinspots, wodurch die zu analysierenden Gele „übereinander gezogen“ werden können. Nach diesem Übereinanderlegen aller Gele kann die Spoterkennung stattfinden und die einzelnen Prozentvolumina kalkuliert werden.

2.2.9 Identifizierung der Proteinspots durch die Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Proteinidentifikation wurde von Frau Dipl. Ing. Grit Nebrich und Herr Dipl. Ing. Oliver Klein durchgeführt.

Unter Massenspektrometrie wird die Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum verstanden. Es besteht aus einer Ionenquelle, die aus der

Substanzprobe einen Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, einem oder mehreren Massenanalysatoren, die die Ionen hinsichtlich des Masse-Ladungs-Quotienten (m/z) auftrennt und einem Detektor, der das Massenspektrum liefert. Welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet wurden, geschieht durch Ablesen anhand des Massenspektrums.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Massenspektrometer verwendet. 1. die *Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation* (MALDI) sowie der *Time of flight-Analyse* (TOF) und 2. der Elektrospray-Ionisierung (ESI) mit nachgeschalteter Ionenfalle. Vor der Identifizierung eines Spots musste ein enzymatischer Verdau der im Spot enthaltenen Proteine erfolgen.

2.2.10 In-Gel Verdau

Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels der gängigsten Methode, dem Protease-Verdau. Im Rahmen dieser Arbeit lag die Wahl der verwendeten Protease bei Trypsin (0,1 μg pro 10 μl Trypsin in 50mM Ammoniumbicarbonat-Lösung für 3 Stunden bei 37°C; optimaler pH bei 8), welches die Proteine an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten spaltete. Die Proteine wurden somit vollständig in gegen Protease-resistente Peptide gespalten und hinterher mittels HPLC (hier: nanoLC) aufgetrennt. Damit das Gel die Protease aufnehmen und die Proteine spalten konnte, fand die Rehydrierung (5% Acetonitril in 25mM Ammoniumbicarbonat in bidestilliertem Wasser (w/v) für 15 Min bei RT) sowie Dehydrierung (50% Acetonitril in 25mM Ammoniumbicarbonat in bidestilliertem Wasser (w/v) für 15 Min bei RT) der Gelspots mittels proteasehaltigen Puffern mit anschließender Auswaschung (100% Acetonitril) der zu identifizierenden Fragmente statt. Die Eluierung der Peptide erfolgte in 0,1% Trifluoressigsäure.

Die verdauten Spots konnten bis zum Messen bei -20°C gelagert werden.

Für eine Identifizierung der Peptide mittels ESI waren 23 μl der tryptisch verdauten Proteinspots nötig, welche in Glasvials überführt wurden. Für die Identifizierung mittels MALDI-TOF/TOF folgte ein Entsalzen über C18-Material.

2.2.11 Präparieren der Peptide für die MALDI-TOF/TOF

Um die Peptide auf dem Target zu präparieren, erfolgte zunächst das Entsalzen der verdauten Proteinspots mittels C18-ZipTipps®. Diese ZipTipps® gleichen Pipettenspitzen, welche mit einem C18-Säulenmaterial befüllt waren. Um mit dem Entsalzen der verdauten

Proteine beginnen zu können, mussten die ZipTips® zunächst folgende Schritte durchlaufen:

1. Aufladen des C18-Materials mit 70% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure;
2. Waschen mit 80% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure
3. Aktivieren des Säulenmaterials mit reiner 0,1% Trifluoressigsäure.

Nach diesen drei Schritten waren die Peptide in der Lage, an die Säulen zu binden, wonach ein Waschschrift in reiner 0,1%igen Trifluoressigsäure und zuletzt das Eluieren der Peptide auf dem Target in 2µl 50% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure stattfand.

Das weitere Verfahren der Präparation der Peptide für die Massenspektrometrie erfolgte über die AnchorChips®-Technologie. AnchorChips® sind mit hydrophilen Patches („Anker“) in einer hydrophoben Umgebung ausgestattet, so dass der relativ hydrophile Analyt sich auf den „Ankern“ konzentrierte. 2µl des Eluats wurde auf den „Anker“ mit einem Durchmesser von 400µm appliziert, worauf die Tropfen auf die Größe des „Ankers“ eintrockneten und schließlich die Pipettierung von 1,5µl Matrixlösung (α -Cyano-4-Hydroxy-zimtsäure in 30% Acetonitril und 70% Trifluoressigsäure) auf die getrockneten Proben stattfand. Als Standard diente 0,3µl Pep-Mix mit 0,8µl Matrix-Lösung. Dieses konventionelle Verfahren ist unter dem Namen Dry-droplet Methode („Getrocknete-Tropfen-Methode“) bekannt.

2.2.12 MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI basierte auf der Kokristallisation der Peptide mit UV-Strahlung absorbierenden Molekülen in einer Matrix. Dabei übertrugen die sauren UV-absorbierenden Moleküle Protonen auf die Proteine/Peptide und luden diese positiv auf. Die Matrix wurde im Hochvakuum des Massenspektrometers mit UV-Laser bestrahlt, so dass die explosionsartige Freisetzung der UV-absorbierenden Matrix-Moleküle und somit auch der eingebauten Peptide stattfand. Es entstand eine Gaswolke, die alle positiv geladenen Peptide einbezog, welche in einem elektrischen Feld beschleunigt wurden und in den *Time of flight* (TOF)-Analysator gelangten. Das elektrische Feld beschleunigte alle Ionen mit der gleichen Energie. Die erreichte Geschwindigkeit eines Ions hing von dem Quotienten der Masse durch Ladung (m/z) ab. So wurden zwei Protonen mit gleicher Ladung, aber unterschiedlicher Masse in unterschiedlicher Geschwindigkeit beschleunigt. Das Protein mit der kleineren Masse enthielt eine höhere Geschwindigkeit und ein zweiwertig positiv geladenes Protein erreichte eine höhere Geschwindigkeit als das gleiche Protein mit nur einer Ladung.

Der TOF-Analysator bestand aus einem feldfreien Vakuumflugrohr, indem die Proteine nicht mehr beschleunigten, sondern mit der erreichten Geschwindigkeit auf den Detektor trafen. Ionen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erreichten den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten. Diese Flugzeiten wurden gemessen. Das in dieser Arbeit benutzte Massenspektrometer enthielt zusätzlich einen Reflektor, der die Ionen umlenkte. Damit wurde die Fluglänge verdoppelt und somit die Auflösung verbessert. Zudem erfolgte die Fokussierung der Ionen mit gleichem m/z aber unterschiedlichen kinetischen Energien am Reflektor (Abbildung 10).

Ein MS/MS-Spektrum ereignete sich anhand des TOF/TOF-Verfahrens. Das Spalten einzelner Peaks in weitere Fragmente erfolgte durch Bestrahlung der Proben mittels höheren Laserniveaus (200Hz „smartbeam“ Laser). Diese höher fragmentierten Peptide wurden durch eine so genannte „Liftzelle“ in der Ionenquelle auf ein höheres Energieniveau gesetzt und somit selektiert und beschleunigt. Ein nachgeschalteter Stabilisator war in der Lage dieses erhöhte Energieniveau aufrechtzuerhalten, so dass die Peptide mit ihrer erreichten Geschwindigkeit erneut durch den TOF-Analysator fliegen konnten, um dann die dabei erreichte Flugzeit am Detektor messen zu können. Anhand dieser Methode konnten auch kleinere Peptide identifiziert werden (Abbildung 10) [127].

Anhand einer MS-spezifischen Software (FlexControl 2.4 Software, Bruker Daltonics) erfolgte die Gewinnung der Massenspektren. Die externe Kalibrierung geschah mittels eines Peptid-Standards, die betriebsinterne Kalibrierung mittels der über die autoproteolytische entstandenen Fragmente der Trypsinverdauung mit den m/z Peaks 842.509 [M^+H^+] und 2211.104 [M^+H^+] sowie der dazugehörigen Software (FlexAnalysis 2.0, Bruker Daltonics). Angezeigt wurden MS/MS- und MS-Peaks mit einem m/z Ratio von 0 bis 4000 Da. Unter einer kombinierten Software-Benutzung von MASCOT Version 2.1 und BioTool (Bruker Daltonics) konnten die MALDI TOF/TOF-Spektren unter folgenden Parametern benannt werden: (i) Datenset: Uniprot_sprot Version 290709, (ii) Taxonomie: *Mus musculus*, (iii) proteolytisches Enzym: Trypsin, (iv) maximale Akzeptanz der vermissten Spaltungen: 1, (v) Massenwert: monoisotop, (vi) Peptidmassentoleranz: ± 100 ppm und (vii) mögliche Modifikationen: Methioninoxidation und Acrylamid-abgeleitete Cysteinaktylierung (Cysteinyll-S-Propionamide). Proteinidentifikationen wurden in Abhängigkeit von ihrem MOWSE Score (Mascot) ($p < 0,05$), der Anzahl der gefundenen Peptide und deren Sequenz-Überlappung

akzeptiert.

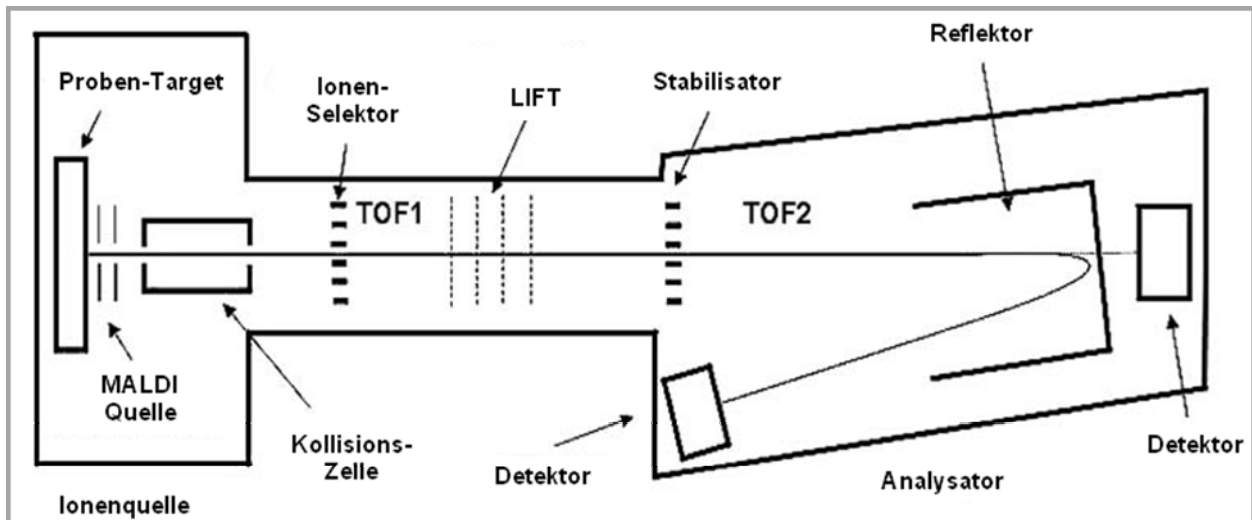


Abbildung 10: Geräteprinzip eines MALDI-TOF/TOF. TOF1 erstreckt sich von der MALDI-Ionenquelle bis zur Lift-Zelle. TOF2 entspricht der zweiten Beschleunigungsphase, welche sich von der Lift-Zelle über den Reflektor bis hin zum Detektor befindet (modifiziert nach Suckau et al., 2003 [127])

2.2.13 Elektronenspray Ionisierung (ESI)-Massenspektrometrie

Alternativ zur MALDI-TOF/TOF bestand die Möglichkeit, ein ESI-Massenspektrometer zu benutzen. Das Verfahren basierte auf einer Elektronenspray-Ionenquelle, der eine *Reversed Phase Pressure Liquid Chromatography* (HPLC)-Anlage vorgeschaltet war.

Die vorgeschaltete HPLC-Anlage (nanoLC) diente zur Entsalzung, Konzentrierung und Auftrennung der tryptisch verdauten Proben. Es waren 2 Säulen in Benutzung: zum einen die kürzere Vorsäule zum Entsalzen (NS-MP-10 Biosphere C18 (5µm, 120 Å, 75µm I.D. x 360µm O.D.; L=20mm)) unter Verwendung von 0,1% tri-Fluoracetinsäure, welche mit einer hohen Fluß-Rate von 8µl/min eingeschleust wurde und zum anderen die längere Hauptsäule zum Separieren der Proben (NS-MP-10 Biosphere C18 (5µm, 120 Å, 75µm I.D. x 360µm O.D.; L=10cm)). Die Eluierung der Peptide von der Säule erfolgte mit Hilfe eines Gradienten, welcher bei 5% v/v 0,1%iger Ameisensäure in Acetonitril und 95% 0,1%iger v/v Ameisensäure in bidestilliertem Wasser startete und bei 95% v/v 0,1%iger Ameisensäure in Acetonitril und 5% 0,1%iger v/v Ameisensäure in bidestilliertem Wasser endete. Die Flußgeschwindigkeit lag hierbei deutlich geringer bei 200nl/min. Nach der Eluierung der Peptide von der Hauptsäule, trafen diese je nach ihrem Gradienten in der ESI ein.

Bei der ESI-Massenspektrometrie wurden die Proteine/Peptide nicht in eine verdampfbare Matrix eingebettet, sondern aus einer Kapillare in feinste Tröpfchen versprüht. Gegenüber

der Kapillare befand sich eine Gegenelektrode. Zwischen Kapillare und Gegenelektrode befand sich eine hohe Potentialdifferenz, so dass je nach Polarität negativ oder positiv geladene Ionen an die Oberfläche der Lösungströpfchen traten. Während die Lösungströpfchen zum Gegenpol gelangten, verdunstete das Lösungsmittel, die Tröpfchen schrumpften, die Ionen innerhalb der Tröpfchen komprimierten und die elektrostatische Abstoßung der Tröpfchen überstieg dessen Oberflächenspannung. Es kam zur so genannten Coulomb-Explosion. Hierbei explodierten die Tröpfchen in noch feinere Tröpfchen. Es entstand Ionengas, welches in einen Quadrupol-Analysator gelangte. Das Gerät bestand aus vier Metallstäben, die parallel und in gleichem Abstand voneinander angeordnet waren. An die diagonalen Partner wurden jeweils eine Wechsel- (V) und eine Gleichspannung (U) angelegt, so dass der Analysator dementsprechend vier Pole aufwies. Zu jedem Ion existierte ein Verhältnis von Gleich- und Wechselspannung (U/V), das dem Ion die Passage durch den Quadrupol erlaubte. Allerdings konnten Peptide nur mit einem bestimmten Massen/Ladungsverhältnis bei einem bestimmten U/V-Verhältnis entlang der vier Pole fliegen, da der Quadrupol als Massenfilter wirkte. Nach dem Bündeln und Filtern der Ionen im Quadrupol, gelangten diese in die Ionenfalle, die die m/z-Werte der Ionen bestimmten, anhand welcher die Ionen selektiv aus der Ionenfalle entlassen und anschließend mittels Detektor bestimmt wurden [128]. Die Erfassung der Peptide erfolgte über drei Abläufen: 1. „Full scan“, die Abbildung aller Peaks, 2. „Zoom Scan“, die Darstellung der intensivsten Peaks des „Full Scans“ und 3. „MS/MS Scan“, die Darstellung der einzelnen Peptide eines „Zoom Scans“.

Die entstandenen MS/MS-Spektren, wurden über die Software BioWorks Version 3.1 (Thermo Scientific) erzeugt und in MASCOT-Formate generiert. Unter Verwendung der MASCOT Software Version 2.1 erfolgte die Analyse der Massenspektren unter folgenden Parametern: (i) Datenbank: Uniprot_sprot Version 290709, (ii) Taxonomie: *Mus musculus*, (iii) proteolytisches Enzym: Trypsin, (iv) maximale Akzeptanz der vermissten Spaltungen: 1, (v) Massenwert: monoisotop, (vi) Peptidmassentoleranz: $\pm 0,8\text{Da}$, (vii) Fragmentmassentoleranz: $\pm 0,8\text{Da}$, (viii) variable Modifikationen: Methioninoxidation und Acrylamid-Adukt der Cysteine. Nur Proteine mit einer Signifikanz $p < 0,05$ und einem MOWSE-Score von 32 bis 37 wurden berücksichtigt.

2.2.14 Datenbanksuche auf Grundlage der Peptidmassenfingerabdruck-Spektren

Um die in den Gelspots enthaltenen Proteine zu identifizieren, wurden diese mit Hilfe der Massenspektrometrie gemessenen Spektren, den so genannten

Peptidmassenfingerabdruckspektren (MALDI-MS) oder Fragmentionsspektren (MALDI-MS/MS oder ESI-MS/MS), mit einer Datenbank verglichen.

Die gemessenen Spektren wurden unter Zuhilfenahme der nichtredundanten NCBI Datenbank mit Hilfe von Biotoools (Version 2.2, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) analysiert und zur automatischen Interpretation der Fragmentionsspektren (MS/MS) der SEQUEST-Algorithmus (Version 2) während des Screenens der NCBI-Datenbank verwendet.

Die Auflistung der Ergebnisse der Massenspektrometrie geschah in Form einer Tabelle, worin jedes identifizierte Protein mit einer Spot-Identifikationsnummer (Spot-ID) versehen und diesen wiederum ein Gencode zugeordnet wurde. Dieser Gencode ist im Gegensatz zu den Proteinamen (es existieren oft verschiedene Namen für das gleiche Protein) eindeutiger. Alle identifizierten Proteine sowie Zusatzinformationen sind im Anhang (Tabelle 20 - Tabelle 25, Tabelle 28 - Tabelle 34) aufgeführt. Im Rahmen der Auswertung wurde zusätzlich der frei zugängliche Online-Dienst „*Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery tool*“ (DAVID, National Institute of Allergy and Infectious Disease) genutzt [129].

2.2.15 Der diskontinuierliche Western Blot (Semi-dry-Blotting)

Das Prinzip des Blottens ist der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran (Nitrozellulose bzw. Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)). Dieses Verfahren ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen, die an die Membranoberfläche, durch Antikörper oder andere bindende Proteine absorbieren. Hierfür müssen allerdings unbesetzte Bindungsstellen blockiert werden, die nicht an den nachfolgenden Reaktionen zum Nachweis der spezifisch bindenden Proteine teilnehmen sollen.

Der Transfer konnte bei einer konstanten Stromdichte von $1,75\text{mA}/\text{cm}^2$ für eine Stunde starten.

Um die freien Bindungsstellen abzusättigen, folgte nach der Waschung eine Blockierung in Blockpuffer für eine Stunde bei RT. Nach dem Blockieren wurden die Antikörper in der jeweiligen Konzentration (β -Aktin 1:5000; PDI 1:1000; HSP60 1:1000; β -Tubulin 1:1000 in Blockpuffer) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C unter Wippen inkubiert.

Anschließend erfolgten drei Waschschritte für jeweils 5 Minuten bei RT. Daraufhin wurden die Membranen mit dem zweiten Antikörper, dem Peroxidase gekoppelten anti-mouse (β -

Aktin) bzw. anti-rabbit (PDI, HSP60 und β -Tubulin) für eine Stunde bei RT inkubiert und erneut gewaschen.

Zur Entwicklung des Blots wurde der Chemilumineszenz-Kit (ECL-Plus Staining; Thermo Scientific) verwendet. Hierzu wurden Reagent A mit Reagent B im Verhältnis 40:1 miteinander vermischt und 500 μ l davon auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgte die Detektion der Antigene durch Entwicklung der Röntgenfilme.

2.2.16 Untersuchungen der Hypertrophie an Mausmodellen

2.2.16.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (ad libitum). Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen unter spezifiziert pathogenfreiem Status (SPF) in individuell ventilierten Standardkäfigen (IVC) in klimatisierten Räumen. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden Tages- und Nachtrhythmus. Eine Überprüfung des Gesundheitszustandes fand täglich durch das Pflegepersonal sowie durch monatliche veterinärmedizinische Untersuchungen statt. Die Tierhaltung und die Tierexperimente wurden durch das Komitee für den Tierschutz an der Charité Universitätsmedizin Berlin geprüft und gemäß den Vorgaben durchgeführt.

Für die Analysen der Polymorphismen und der damit einhergehenden Proteinexpressionsveränderungen am Krankheitsmodell wurde aufgrund der Ergebnisse als interessanter konsomischer Stamm CS14 beider Geschlechter ausgewählt. Als Kontrolle dienten B6-Tiere. Die Züchtung der Mäuse geschah am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der Arbeitsgruppe Lehrach (Berlin, Deutschland).

2.2.16.2 Studiendesign

Vor Versuchsbeginn war es notwendig, die Tiere innerhalb des Geschlechts in verschiedene Gruppen randomisiert aufzuteilen. Die Gruppeneinteilung und die Anzahl der Tiere sind

Tabelle 8 zu entnehmen. Im Alter von neun bis zehn Wochen und einem Körpergewicht zwischen 18 und 25g starteten die Versuche.

Die Gruppengröße unterschied sich, da in der Versuchsplanung eine höhere postoperative Mortalität in den TAC-Gruppen erwartet wurde. Diese war in der Versuchsdurchführung in geringem Maße eingetreten. Die Mortalitätsrate betrug 10-15 %.

Tabelle 8: Studiendesign

Gruppenbezeichnung	Männliche Tiere	Weibliche Tiere
WT Sham	6	6
WT TAC	8	8
C14 Sham	6	6
C14 TAC	8	8

Zum Zeitpunkt d0 erfolgte die Induktion der kardialen Hypertrophie durch einen operativen Eingriff der transversalen Aortenkonstriktion (TAC). Bis zu ihrem Todeszeitpunkt wurden die Tiere an Tag – d1, d14, d28, d42 und d62 echokardiographisch untersucht. Die zeitliche Abfolge der Interventionen sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

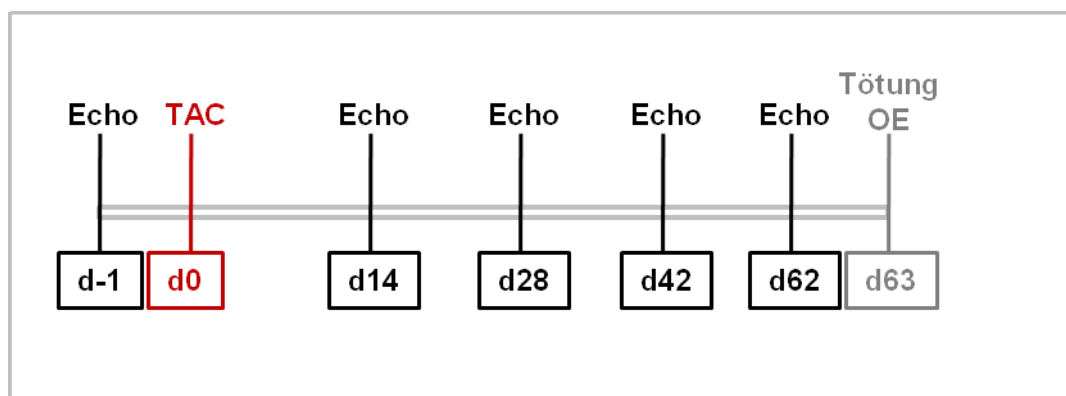


Abbildung 11: Zeitstrahl des Studiendesigns. Um den Verlauf der Hypertrophie-Entwicklung zu dokumentieren wurde ein Tag vor der Operation sowie 14, 28, 42 und 62 Tage postoperativ Echo-Aufnahmen durchgeführt. An Tag 63 fand die Tötung durch Genickbruch statt.

2.2.16.3 Echokardiographie

Die kardialen Untersuchungen der Pumpfunktion sowie der Wanddicken fanden sowohl für Kontroll- als auch für TAC-Tiere echokardiographisch statt. Das Ausmaß der Hypertrophie wurde anhand der echokardiographischen und morphologischen (gewogenes Herzgewicht und Körpergewicht) Daten ermittelt.

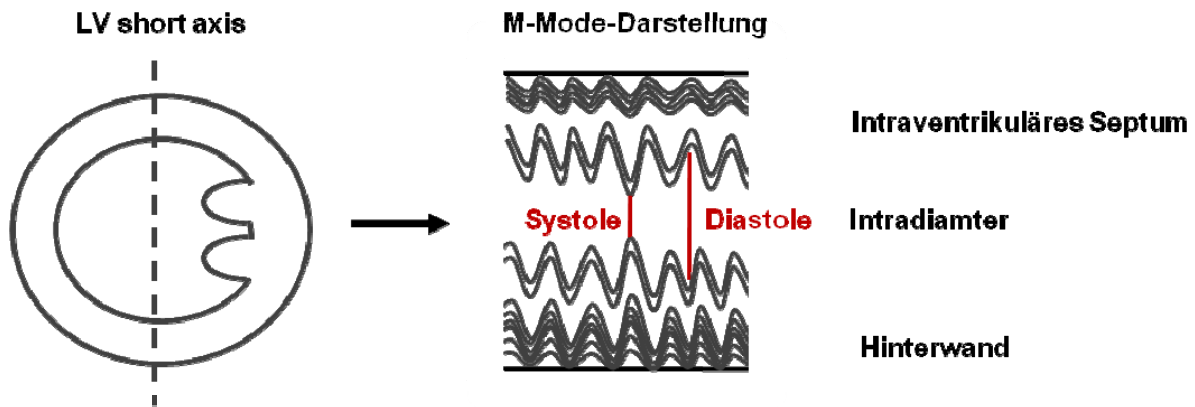


Abbildung 12: Schematische Darstellung der echokardiographischen Messung. Die gestrichelte Linie der linksventrikulären kurzen Achse (LV short axis) stellt die Messebene für den M-Mode dar.

Die Hypertrophieentwicklung konnte anhand des echokardiographischen Monitorings genau dokumentiert werden. Hierzu fand die Narkotisierung der Tiere mit 1,5% Isofluran statt. Um eine Verfälschung der Daten zu vermeiden, musste die Herzschlagfrequenz der Tiere bei über 400 Schläge/Minute liegen. Das Echogerät (VisualSonics Vevo 700) war ausgestattet mit einem Schallkopf für Kleinnager (25-35 MHz). Die Darstellung erfolgte im zweidimensionalen Modus in der parasternalen Kurzachsenansicht (short axis) worin der M-Mode senkrecht auf das Septum und die Hinterwand fällt (Abbildung 12). Die Messung fand auf Höhe der Papillarmuskeln statt. Mit anschließender Einstellung eines M-Mode-Echokardiogramms konnten folgende Parameter für die Diastole (d) und die Systole (s) bestimmt werden:

1. Linksventrikuläre Hinterwand (LVPW)
2. Linksventrikulärer Intradiameter (LVID)
3. intraventrikuläres Septum (IVS)

Durch die gemessenen Parameter ließen sich folgende Merkmale berechnen:

1. Linksventrikuläre Muskelmasse (LVM) nach der Penn-Cube-Formel [130, 131]:

$$LVM = 1,05 ((LVIDd + LVPWd + IVSd)^3 - LVIDd^3)$$

2. Ejektionsfraktion (EF): gibt Auskunft über die systolische Funktion des Herzens und ist die prozentuale Auswurfsfraktion vom maximalen Volumen des LV:

$$EF = ((LV_{\text{void}} - LV_{\text{vols}}) / LV_{\text{void}}) * 100$$

3. Dilationskoeffizient (Th/r) gibt Information über die Hypertrophieform. Th/r von 0,33 gilt als physiologisch. Ein $Th/r > 0,33$ zeigt eine kompensierte Hypertrophie, ein $Th/r < 0,33$ eine exzentrische Hypertrophie:

$$Th/r = (2 * PWd/LVIDd) [43, 132]$$

Abbildung 13 stellt exemplarisch für jede der untersuchten Gruppen die echokardiographischen Aufnahmen im M-Mode dar.

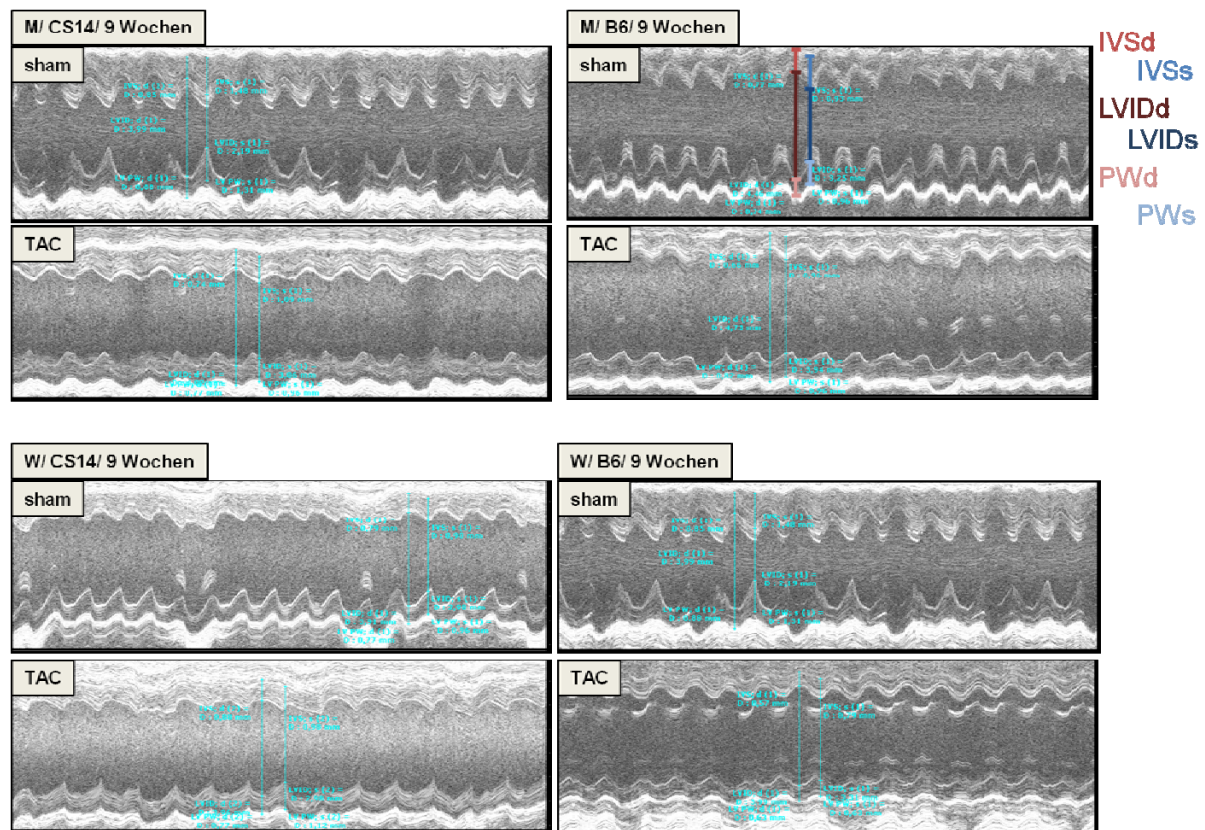


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der echokardiographischen Aufnahme im M-Mode

2.2.16.4 Induktion der Hypertrophie durch Transversale Aortenkonstriktion (TAC)

Zur Induktion einer kardialen Hypertrophie stellt die TAC ein anerkanntes und publiziertes Verfahren dar. Hierzu wird um den Aortenbogen zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der Aorta carotis communis sinistra eine Ligatur gelegt (Abbildung 14) [133, 134].

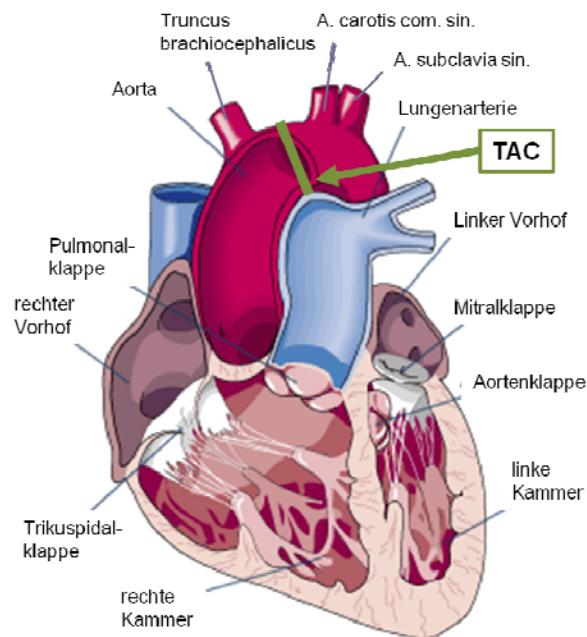


Abbildung 14: Schematische Darstellung der transversalen Aortenkonstriktion. Der grüne Pfeil zeigt die Position, an der die TAC durchgeführt wurde (modifiziert nach http://i.onmeda.de/herzklappen_herzanatomie.gif)

Für diesen operativen Eingriff wurden die Mäuse mit 1mg/kg Körpergewicht Ketamin/Xylazin anästhesiert und endotracheal mit einem Plastiktubus (22G Venenverweilkatheder) intubiert. Mit einem Atemzugvolumen von 200 μ l und einer Respirationsrate von 200 Atemzügen/min konnten die narkotisierten Mäuse mit Raumluft beatmet werden. Nach einer erfolgreichen Sternotomie wurde der Aortenbogen freigelegt (Abbildung 15A) und anschließend die Aorta isoliert. Um eine konstante Ligatur von 0,4mm Aortendurchmesser zu ermöglichen fand diese mit einer 6.0 Seidennaht um eine 26 Gauge-Nadel statt (Abbildung 15B). Nach der sofortigen Entfernung der Gauge-Nadel (Abbildung 15C und D) erfolgte die Verschiebung des Thorax (6.0 Seidennaht) und der Haut (6.0 Polyesterfaden). Die Kontroll-Tiere durchliefen die gleiche Prozedur wie die TAC-Tiere, allerdings erfolgte die Operation ohne Aortkonstriktion. Die OP-Dauer betrug ca. 20 Minuten. Zur Analgesie wurden die Tiere postoperativ für 72 Stunden mit Rimadyl (5mg/kg Körpergewicht) versorgt und bis zum Erwachen aus der Narkose beobachtet. Die Körpertemperatur konnte mit Hilfe einer Rotlichtlampe konstant gehalten werden.

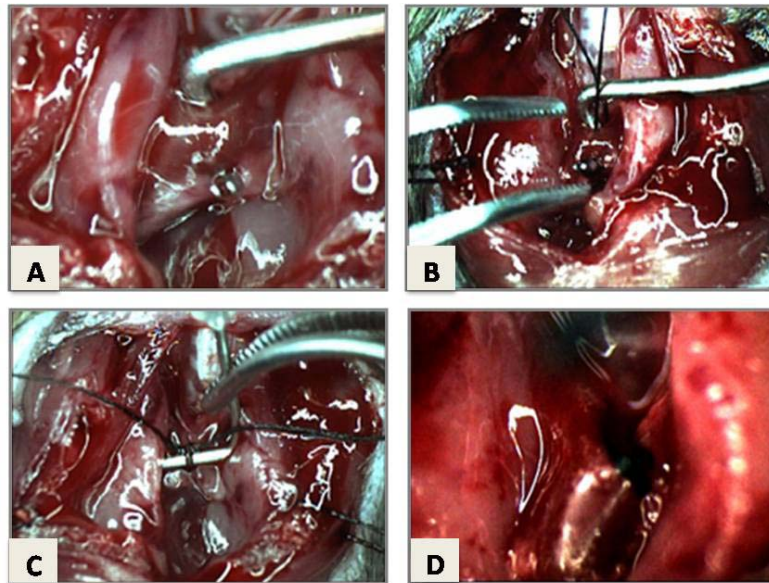


Abbildung 15: Durchführung einer TAC-Operation. Die Bilder A-D dokumentieren die Operations-Technik. Nach Öffnen des Bauchraumes und Exponierens des Aortenbogens mit einem speziell angefertigten Hakens (A) wird der Seidenfaden um die Aorta gelegt (B) und anhand der Gauge-Nadel als Abstandshalters das „Bandling“ gelegt (C). Nach Entfernen des Abstandshalters (D) kann der Bauchraum wieder geschlossen werden (modifiziert nach [135]).

2.2.16.5 Organentnahme

Nach 9 Wochen wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet und das Herz, für weitere Versuche entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Nach der Probenaufarbeitung fand eine Proteinquantifizierung mittels 2-DE statt sowie eine folgende Identifizierung durch die Massenspektrometrie.

2.2.17 Statistische Auswertung

Statistische Analysen der proteinbiochemischen Daten wurden beim Vergleich der zu untersuchenden Gruppe CS vs. B6 anhand des Statistikpakets Microsoft Office Excel 2007 untersucht. Als statistisches Werkzeug wurde der zweiseitige TTest gewählt, der die Mittelwerte zweier Stichproben auf die Gleichheit der Mittelwerte beider Grundgesamtheiten bei gleicher Standardabweichung prüft (homoskedastisch). Bei den statistischen Analysen im Krankheitsmodell mussten mehrere Faktoren miteinander verglichen werden, so dass die übliche Anwendung des Student's TTests nicht stattfinden konnte. Um einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen konsumischer Stamm (CS14 und B6), Geschlecht (männlich und weiblich) sowie Hypertrophie-Einwirkung (TAC und Sham) zu erhalten, wurden die Proteomdaten anhand der multifaktoriellen Varianzanalyse (**analysis of variance**, ANOVA) getestet und bei beobachteten Wechselwirkungen ein Tukey B-Test durchgeführt. Hierzu wurde das Statistikpaket PASW 18.0 verwendet. Sowohl beim TTest als auch bei der

ANOVA galten die Werte bei einem p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich. Die graphische Darstellung erfolgte in Säulendiagrammen.

Die echokradiographischen Daten wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA untersucht. Im Fall eines signifikanten ($p < 0,05$) Ergebnisses erfolgten post-Hoc Vergleiche nach Dunnett (Behandlung vs. Placebo). Alle Werte sind als Mittelwerte und Standardfehler (standard error of the mean) ($MW \pm SEM$) angegeben. Die graphische Darstellung der Daten erfolgten zum Einen in Säulendiagrammen und zum anderen in „Boxplots“. Als Box werden durch Quartile bestimmte Rechtecke bezeichnet, die 50% der Daten umfasst. Die Länge der Box gibt den Interquartilsabstand an, welcher als Maß der Streuung dient und durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt wird. Ein weiterer Quartil ist der Median, der als horizontale Linie dargestellt ist und durch seine Lage einen Eindruck über die „Schiefe“ der Daten gibt. Das untere Quartil zeigt 25% an, das obere 75%.

Die Prüfung auf Korrelation der mRNA-Daten (MPI, Berlin) und der Proteomdaten auf unterschiedliche Parameter erfolgte mittels Streudiagramme mit anschließender Pearson-Analyse, wodurch die Bestimmung des Bestimmtheitsmaßes (R^2) und des Korrelationskoeffizienten (r) resultierte. Ein Wert von $|r|=1$ zeigte eine statistische Abhängigkeit, ein Wert von $|r|=0$ eine statistische Unabhängigkeit der zu untersuchenden Merkmale. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass eine statistische ($p < 0,05$) Korrelation bei Werten $r > 0,7$ besteht. Diese Analysen wurden mit dem Statistikpaket PASW 18.0 durchgeführt.

Aortenstenose fand die Tötung der Tiere sowie deren Proteinuntersuchung mit Hilfe der 2-DE und anschließender Massenspektrometrie statt. Anhand der Software *Delta2D* fand eine Analyse der Herzen hinsichtlich ihres Proteoms von 11 Wochen alten Tieren (n=6) für das Screening und 19 Wochen alten Tieren (n=6) nach OP statt.



Abbildung 17: Exemplarische Darstellung eines 2-DE Proteinmusters eines Maus-Herzens. Nach der eindimensionalen Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt erfolgte die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Die blau eingekreisten Punkte zeigen aufgetrennte Proteinspots eines Gesamtextraktes eines Mäuseherzens. Insgesamt konnten 2800 Proteinspots detektiert werden

3.1 Untersuchung der parentalen Maus-Stämme (C57BL/6, PWD/Ph und F1(B6*PWD))

3.1.1 Vergleich der Phänotypen zwischen den parentalen Stämmen in beiden Geschlechtern

Unter den Phänotypen waren folgende Merkmale deklariert: das Körpergewicht (KG), die Herzrate (HR), die Masse des linken Ventrikels in Relation zum Körpergewicht (LVM/KG), das interventrikuläre Septum (Vorderwand) in der Systole (IVSs) und in der Diastole (IVSd), den linksventrikulären Intradiameter sowohl in der Systole (LVIDs) als auch in der Diastole (LVIDd), die linksventrikuläre Hinterwand in der Systole (LVPWs) sowie in der Diastole

(LVPWd) und die prozentuale Ejektionsfraktion (%EF). Diese Parameter erlauben eine Aussage über den phänotypischen Zustand der Herzen zu machen.

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung des Körpergewichtes (KG), der Herzrate (HR), der Vorderwände (IVSs und IVSd), der Hinterwände (LVPWs und LVPWd) und dem Differentialkoeffizienten (Th/r) in den parental Stämmen männlicher und weiblicher Mäuse. * $p < 0,05$ bei PWD/Ph vs. B6 bzw. F1 vs. B6; # bei PWD vs. F1

	C57BL/6		PWD/Ph		F1(B6*PWD)	
	male	female	male	female	male	female
KG (mg)	20,7 ± 1,29	19,2 ± 1,04	17,01 ± 1,00*	15,66 ± 1,78*	24,78 ± 0,95* [#]	19,32 ± 1,08* [#]
HR (beats/min)	442,6 ± 68,68	430,3 ± 42,37	489,86 ± 24,24	474,58 ± 28,32	497,60 ± 60	403,33 ± 16,01 [#]
IVSs (mm)	0,8 ± 0,09	0,8 ± 0,10	1,02 ± 0,10*	1,19 ± 0,13*	0,96 ± 0,04*	0,94 ± 0,05*
IVSd (mm)	0,6 ± 0,08	0,7 ± 0,10	0,75 ± 0,05*	0,81 ± 0,08	0,73 ± 0,03*	0,72 ± 0,01
LVPWs (mm)	0,8 ± 0,11	0,9 ± 0,18	1,06 ± 0,15*	1,12 ± 0,15*	0,92 ± 0,05	0,93 ± 0,06
LVPWd (mm)	0,6 ± 0,09	0,7 ± 0,10	0,78 ± 0,06*	0,84 ± 0,10*	0,73 ± 0,03	0,73 ± 0,02
Th/r	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,07	0,45 ± 0,06*	0,54 ± 0,12*	0,35 ± 0,01 [#]	0,34 ± 0,06 [#]

PWD-Mäuse besitzen von Natur aus eine kleinere Körpergröße und ein geringeres Körpergewicht als B6. Werden die Gewichte der linken Ventrikel mit der Körpergröße in Relation gesetzt, zeigte sich ein größeres Verhältnis bei PWD als bei B6. Bei männlichen PWD sogar signifikant. Zum Aufbau der Herzen wurde echokardiographisch gezeigt, dass PWD-Mäuse sowohl in der Systole als auch in der Diastole eine signifikant stärkere IVS und LVPW besitzen als B6 sowie einen geringeren LVID. Bei Betrachtung des Th/r zeigte sich in den PWD eine signifikante Erhöhung sowie in der EF.

Die F1-Generation zeigte sich mit ihren phänotypischen Eigenschaften intermediär. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden bis auf die LVM nicht beobachtet. Der linke Ventrikel war bei Weibchen schwerere als bei Männchen (Tabelle 9, Abbildung 18).

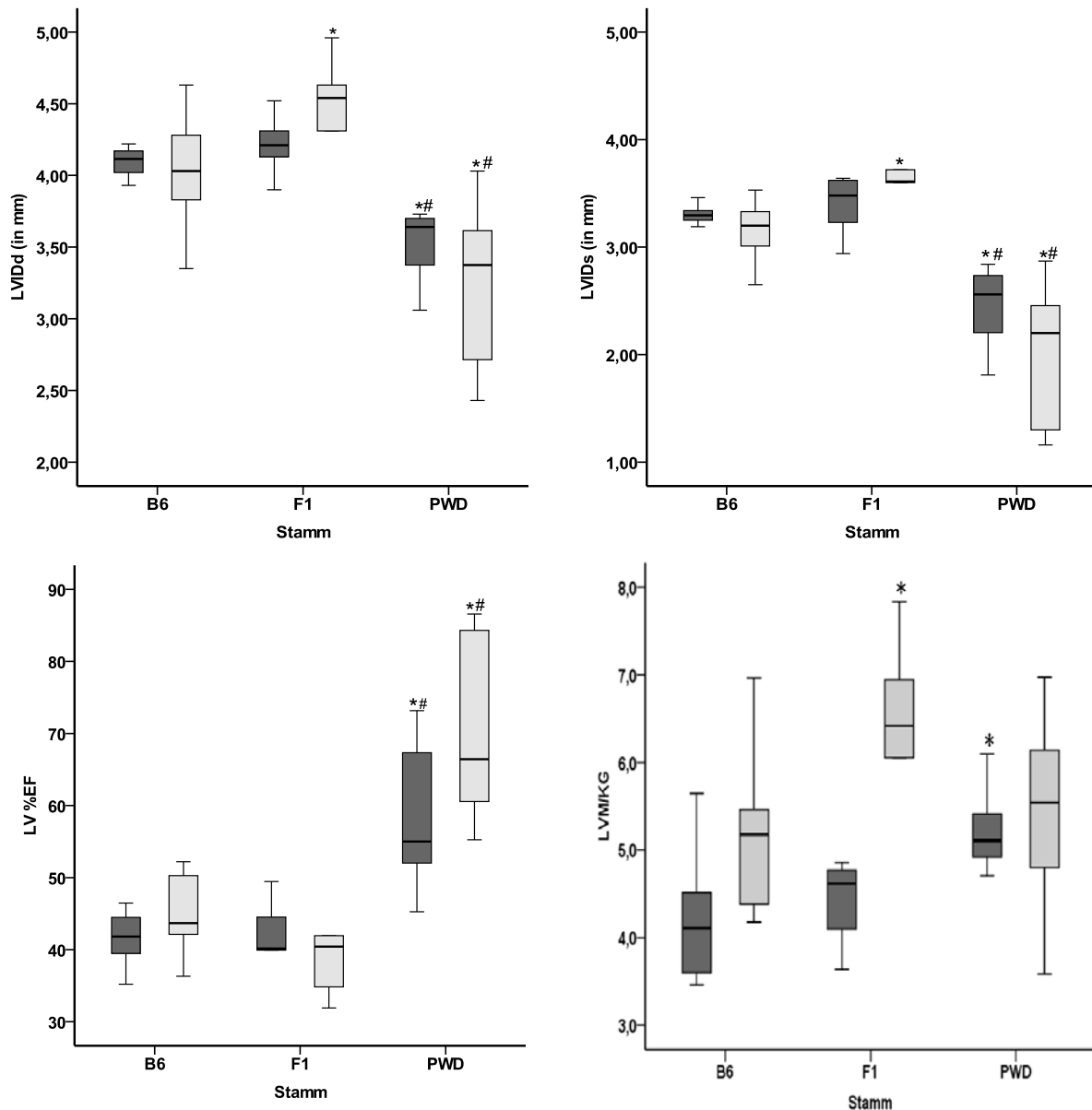


Abbildung 18: Darstellung des linksventrikulären Innendiameter, der Ejektionsfraktion und der LVM/KG in männlichen (dunkelgrau) und weiblichen (hellgrau) parentalen Stämmen. * $p < 0,05$ für PWD bzw. F1 vs. B6; # $p < 0,05$ für F1 vs. PWD. Geschlechterunterschiede wurden nicht detektiert.

3.1.2 Alterierende Proteine der Elterntiere im Vergleich

3.1.2.1 Vergleich der parentalen Stämme

Abbildung 19 zeigt die Anzahl der signifikant veränderten Proteinspots sowohl der männlichen als auch der weiblichen Tiere. Der Vergleich männlicher Tiere PWD vs. B6 zeigte 67 Proteinspots, welche in ihrem Expressionslevel differieren. Zwischen den männlichen und weiblichen Tieren zeigte sich jedoch ein auffälliger Unterschied: knapp die Hälfte aller männlich alterierenden Proteinspots waren in den Weibchen variant (38

Proteinspots). Die Anzahl der veränderten Proteine der F1-Generation sowohl im B6- als auch im PWD-Vergleich zeigten in beiden Geschlechtern um die 80 Varianten.

Eine analoge Beobachtung konnte in der Analyse der hoch- und runterregulierten Proteine gemacht werden. Im Vergleich von PWD mit B6 waren 57% der varianten Proteine in männlichen Tieren hochreguliert, aber nur 29% in Weibchen. In der F1-Generation zeigten sowohl im Vergleich zu B6 als auch zu PWD der prozentuale Anteil der hochregulierten Proteine sowohl in männlichen als auch in weiblichen F1-Tieren ca. 63%.

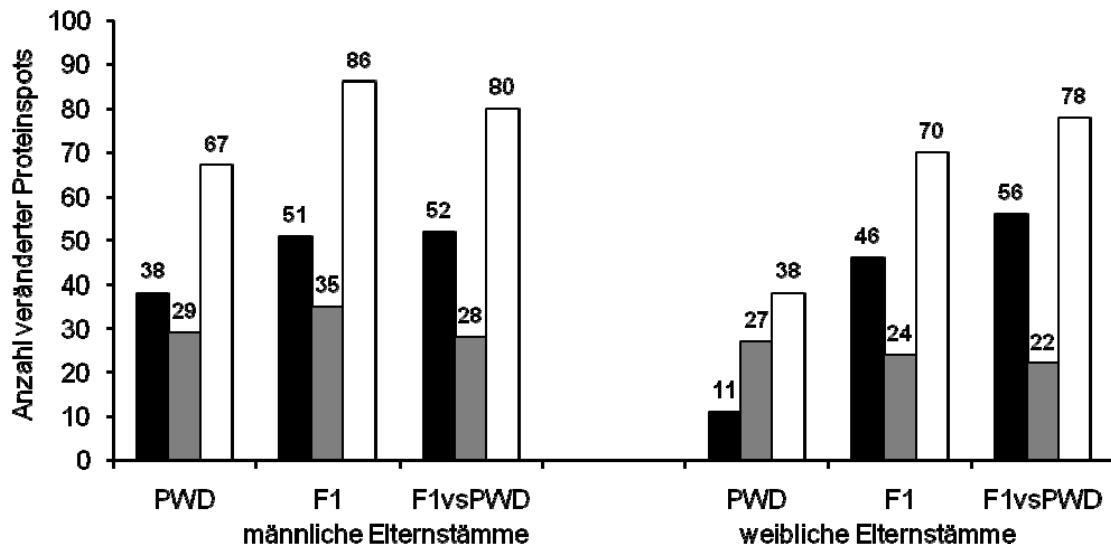


Abbildung 19: Anzahl signifikant ($p < 0,05$) veränderter Proteinspots in den männlichen (links) und weiblichen (rechts) parental Stämmen im Vergleich zu B6. Hierbei zeigen die schwarzen Säulen die stärker exprimierte Proteinspots, die grauen, die niedriger exprimierte Spots und die weißen, die Gesamtanzahl aller signifikant veränderten Proteinspots.

3.1.2.2 Vergleich der Geschlechter (männlich versus weiblich)

In B6 zeigten sich mehr als doppelt so viele Proteinvarianten im Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere als in PWD. Die Anzahl der hoch- und runterregulierten Proteinvarianten waren in B6 ähnlich, dagegen existierten in den männlichen PWD-Mäusen mehr runter- als hochregulierte alterierende Spots. Bei Betrachtung der F1-Generation waren mehr variante Proteine als in den B6- und vor allem mehr als in den PWD-Tieren detektiert worden. Die Anzahl der geschlechts-spezifischen runterregulierten Varianten war stark erhöht (Abbildung 20).

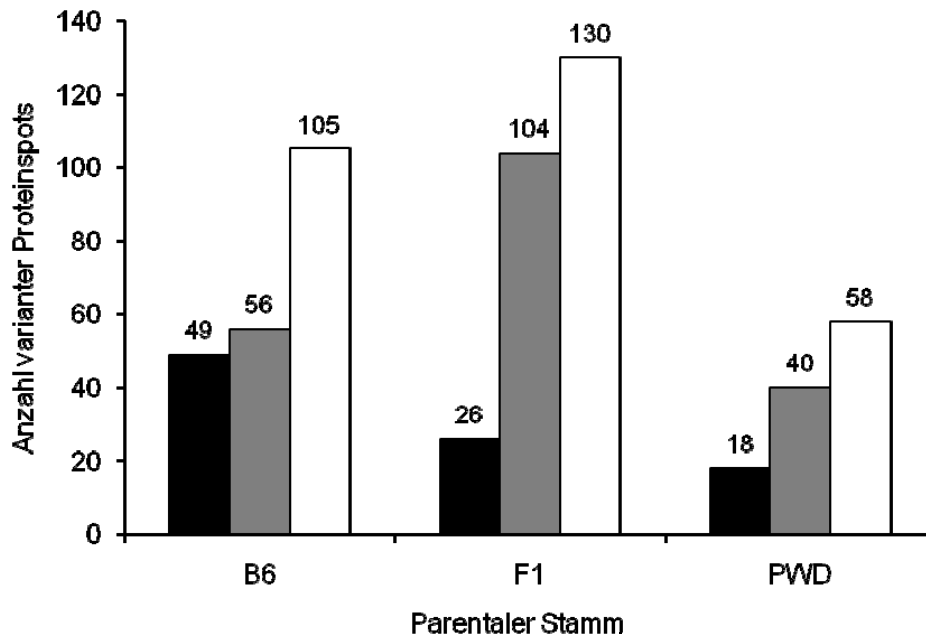


Abbildung 20: Anzahl aller geschlechts-spezifischer signifikant alterierender Proteinspots. Schwarze Säule geben die erhöht exprimierte Proteinspots an, grau die niedriger exprimierte Proteinspots und weiß die Gesamtzahl aller signifikant veränderter Spots zwischen männlichen und weiblichen Mäusen

3.1.3 Klassifizierung der Proteinvarianten der parentalen Stämme

Für eine funktionelle Charakterisierung der veränderten Proteine wurde ein großer Teil der varianten Proteinspots aus den 2DE-Gelen mit MS identifiziert (Tabelle 20 - Tabelle 23). Mit Hilfe des „web-accessible DAVID program“ wurden die Proteine nach verschiedenen KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) -Stoffwechselwegen und „gene ontology categories“ (GO) (biologische Prozesse und zelluläre Komponenten) klassifiziert.

3.1.3.1 Vergleich der parentalen Stämme

Bei einem Vergleich der Stämme PWD vs. B6 zeigten Männchen (M) und Weibchen (W), dass die varianten Proteine in hohem Maße (M: 51.7% und W: 63.2%) die mitochondrialen Proteine und in diesem Zusammenhang den Energiemetabolismus betrafen. Unterschiede zwischen PWD und B6 wurden auch bei morphologischen/physiologischen Merkmalen des Herzens gefunden (siehe Kapitel 3.1.1). Keine Unterschiede zeigten sich in diesem Vergleich zwischen Männchen und Weibchen (Tabelle 10).

Im Vergleich der F1-Generation mit den jeweiligen parentalen Stämme B6 bzw. PWD, spiegeln sich ebenfalls als variante Hauptkomponenten die Mitochondrien und dem daraus resultierenden Energiemetabolismus wieder. Ein geringerer Anteil stellten die kontraktile

Fasern dar, wodurch zumindest in den weiblichen Tieren die Kardiomyopathien im F1 vs. B6- Vergleich und die Herzentwicklung im F1 vs. PWD-Vergleich beeinflussbar waren (Tabelle 10).

Tabelle 10: Proteine mit stammspezifischen Proteinveränderungen wurden GO-annotiert (Level 3) in den Kategorien "biologische Prozesse" und "zelluläre Komponenten" sowie in KEGG-Stoffwechselwege sortiert

	Funktionelle Kategorie	Variante Protein (%)*		
		PWD vs. B6	F1 vs. B6	F1 vs. PWD
männlich				
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	51.7	47.2	51.5
	Kontraktile Fasern	10.3	13.9	9.1
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	46.2	40.0	46.67
KEGG	Oxidative Phosphorylierung	13.8	-	-
weiblich				
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	63.2	53.3	64.7
	Kontraktile Fasern	-	13.3	8.8
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	47.1	50.0	48.4
	Herzentwicklung	-	-	8.8
KEGG	Hypertrophierte Kardiomyopathie	-	10.0	-
	Diletierte Kardiomyopathie	-	10.0	-
	Zitronensäurezyklus	-	-	8.8
	Glykolyse/Gluconeogenese	-	-	8.8

*100%: identifizierte, variante Proteine im Vergleich PWD vs. B6

3.1.3.2 Vergleich der Geschlechter (männlich versus weiblich)

Neben den stammspezifischen Unterschieden, werden nun die geschlechtsspezifisch varianten Proteine durch Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere innerhalb der Stämme (B6, PWD und F1) analysiert. Wie oben bereits beschrieben erfolgte hier die funktionelle Klassifizierung der signifikant varianten Proteine mit Hilfe der DAVID Datenbank.

Ein deutlicher Unterschied zwischen männlich und weiblich zeigte sich in den mitochondrialen Proteinen und resultierend daraus im Energie-Stoffwechsel. Besonders auffällig bei F1: über die Hälfte aller Proteine waren in Mitochondrien lokalisiert, und über 40% in den Energiestoffwechsel involviert. Zwei weitere Gruppen bildeten das Zytoskelet

und die kontraktile Fasern. Auch hier zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede (Tabelle 11).

Tabelle 11: Proteine mit geschlechtsspezifischen Proteinveränderungen wurden GO-annotiert (Level 3) in den Kategorien "biologische Prozesse" und "zelluläre Komponenten" sowie sortiert in KEGG-Stoffwechselwege

Funktionelle Kategorie		Variante Proteine (%) male vs female*		
		B6	PWD	F1
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	40.5	30.4	56.4
	Zytoskelet	19.0	26.1	-
	Kontraktile Fasern	9.5	13.0	7.3
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	30.3	36.8	44.7
	Herzentwicklung	7.1	-	-
KEGG	Oxidative Phosphorylierung	9.5	13.0	7.3
	Kardiale Muskelkontraktion	11.9	-	-
	Hypertrophe Kardiomyopathie	7.1	-	-
	Dilatierte Kardiomyopathie	7.1	-	-

*100%: identifizierte, variante Proteine im Vergleich male vs. female

3.2 Untersuchung der konsomischen Mausstämme

Von konsomischen Stämmen ist bisher wenig bekannt, aufgrundessen war es notwendig die Herzen der Tiere im gesunden Stadium auf ihr mRNA-Level und ihr Proteinmuster zu testen. Hierzu wurden 5 konsomische Stämme (CS5, CS12, CS14, CS16 und CS19) sowohl männlicher als auch weiblicher Tiere (n=6 pro Gruppe) untersucht, wobei als Kontrollgruppe Mäuse des B6-Stammes dienten.

3.2.1 Vergleich der Proteinmuster der konsomischen Stämme

Zu Beginn fand ein Vergleich der Proteinmuster aller CS-Mauslinien mit den B6-Mäusen als Kontrollen statt. Dabei wurden von 3467 detektierten Spots 397 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteinspots ($p < 0,05$) entdeckt (Abbildung 21). Dies entsprach einem prozentualen Anteil von ca. 10%.

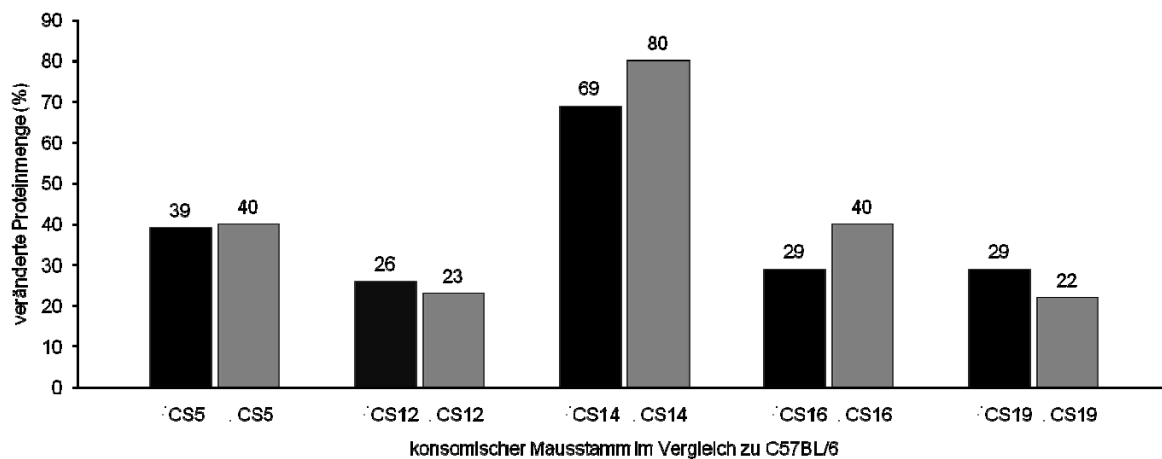


Abbildung 21: Darstellung aller signifikant ($p < 0,05$) veränderter Proteinspots aufgeteilt in den einzelnen konsomischen Mauslinien. Schwarze Säulen gibt die Anzahl aller veränderter Proteinspots in männlichen; graue Säulen in weiblichen konsomischen Mäusen an.

Die höchste Anzahl signifikant veränderter Proteinspots im Herzen innerhalb der 5 konsomischen Mauslinien zeigten sich sowohl in männlichen als auch in weiblichen CS14-Tieren (M: 80 Spots; W: 69 Spots). CS12-Tiere wiesen dagegen die geringste Anzahl an varianten Proteinspots auf (M: 26 Spots; W: 23 Spots), obwohl die beiden ausgetauschten Chromosomen in ihren Basenpaaren (bp) in etwa gleich lang waren (CS12: 121 Mill. bp; CS14: 125 Mill. bp). Beim Vergleich der männlichen und weiblichen Mäuse war auffallend, dass die Anzahl der varianten Proteinspots zwischen den Geschlechtern einander ähnelten (Abbildung 21).

Beim Vergleich der Expressionslevel der Proteine konnte eine unterschiedliche Regulierung der Proteinspots in männlichen und weiblichen Tieren festgestellt werden. So ergab sich eine vermehrte Überexpression der signifikant veränderten Proteinspots im männlichen Proteinmuster und im Gegenteil dazu eine vermehrte Unterexpression der Proteinspots im weiblichen Proteinmuster. Ausnahmen stellten in beiden Geschlechtern CS19 dar (Abbildung 22)

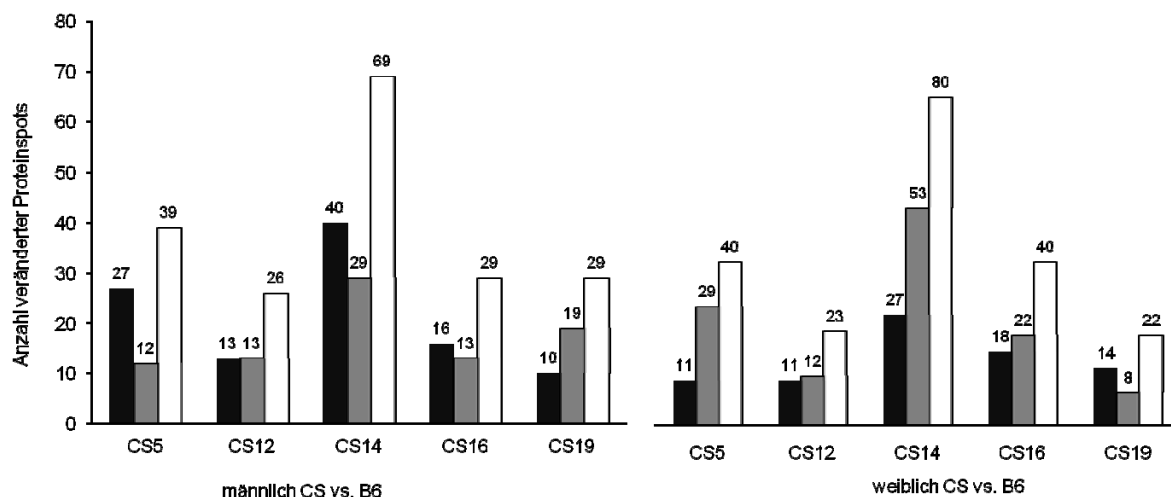


Abbildung 22: Hoch- und Runterregulation in männlichen und weiblichen konsomischen Stämmen. Anzahl aller Proteinspots in männlichen (links) und weiblichen (rechts) Mausstämmen, wobei schwarz alle stärker exprimierten, grau alle vermindert exprimierten und weiß die Gesamtzahl aller signifikant ($p < 0,05$) veränderter Proteinspots darstellt.

3.2.2 Klassifizierung der varianten Proteinspots der konsomischen Stämme

Alle Proteinspots, die hinsichtlich ihrer Abundanz zwischen konsomischen Mausstämmen und der Kontrollgruppe B6 signifikant verändert waren, wurden wie oben bereits beschrieben analytisch quantifiziert und mittels MS gemessen. Insgesamt 70% der Proteinspots konnten so identifiziert und durch die Datenbank DAVID klassifiziert werden. Die Betrachtung der konsomischen Mauslinien fand zunächst getrennt nach Geschlecht statt (Tabelle 12).

Wie bereits bei den parental Stämmen analysiert, spielten die Veränderungen der mitochondrialen Proteine und damit der Energiestoffwechsel in den konsomischen Stämmen ebenfalls eine Rolle. Sowohl in männlichen als auch weiblichen Mäusen waren im Durchschnitt 42% aller varianten Proteine in den Mitochondrien lokalisiert und ca. 22% in den Energiestoffwechsel involviert. Eine Ausnahme stellten hierbei CS16 dar. Hier zeigten sich zwar Veränderungen in den mitochondrialen Proteinen, aber keinerlei Abweichungen im Energiemetabolismus. Nicht nur wegen des Auftretens der meisten Varianten, sondern auch wegen der veränderten Proteinklassen, stellte sich CS14 als interessanter Stamm dar. Sowohl in männlichen als auch weiblichen CS14-Mäusen waren Proteine des Zytoskeletts im Vergleich zu B6 abundant, welche für die Herzentwicklung und Muskelkontraktion von Interesse sind. Bei der Sortierung der varianten Proteine nach den KEGG-Stoffwechselwegen zeigten die CS14-Stämme in den Kardiomyopathieformen, wie dilatierte und hypertrophierte Kardiomyopathie, Abweichungen gegenüber B6, so dass dieser Stamm für die Untersuchungen im Krankheitsmodell von Interesse war (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich der konsomischen Mauslinien (CS) mit den Kontrolltieren B6, nach Geschlecht getrennt. Proteinveränderungen wurden GO-annotiert (Level 3) in den Kategorien "biologische Prozesse" und "zelluläre Komponenten" sowie sortiert in KEGG-Stoffwechselwege.

Funktionelle Kategorie		Variante Proteine (%) CS vs. B6*				
		CS5	CS12	CS14	CS16	CS19
männlich						
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	34.8	38.5	51.6	45.5	40.0
	Aktin Zytoskelett	13.0	-	12.9	-	-
	Kontraktile Fasern	-	-	12.9	-	-
	Myosinkomplex	8.7	-	9.7	-	-
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	21.7	23.1	43.5	-	33.3
	Herzentwicklung	-	-	17.4	-	-
	Muskelkontraktion	-	-	13.0	-	-
KEGG	Oxidative Phosphorylierung	-	-	16.1	-	20.0
	Zitronensäurezyklus	-	-	16.1	-	-
	Kardiale Muskelkontraktion	-	-	16.1	-	-
	Hypertrophe Kardiomyopathie	-	-	16.1	-	-
	Dilatierte Kardiomyopathie	-	-	16.1	-	-
weiblich						
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	40.0	45.5	40.6	40.0	45.5
	Kontraktile Fasern	15.0	-	9.4	13.3	-
	Aktinzytoskelett	-	-	12.5	-	-
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	25.0	36.4	20.7	-	18.2
	Muskelkontraktion	-	-	10.3	13.3	-
	Regulierung der Herzkontraktion	-	-	-	13.3	-
KEGG	Oxidative Phosphorylierung	15.0	-	-	-	-
	Kardiale Muskelkontraktion	-	-	9.4	-	-
	Hypertrophe Kardiomyopathie	-	-	9.4	-	-
	Dilatierte Kardiomyopathie	-	-	9.4	-	-

*100%: identifizierte, variante Proteine im Vergleich CS vs. B6

3.2.2.1 Myosin heavy chain 6 (Myh6) in CS14 vermindert exprimiert

Nach genauerer Betrachtung, war ein Bereich bei CS14 im Vergleich zu B6 im Proteinmuster sehr auffällig. Hierbei war eine gesamte Proteinspot-„Wolke“ komplett verändert. Es stellte sich heraus, dass diese Wolke aus rund 100 Spots bestand (Abbildung 23). Diese Spots erwiesen sich als ein gesamtes Protein, dem Myh6. Die Expression all dieser Spots waren sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Tieren herunterreguliert, jedoch verstärkt in den männlichen CS14-Mäusen. Ebenfalls vermindert

exprimiert war die Myh6-„Wolke“ in den analysierten CSY-Tieren, aber nicht in den parentalen Stämmen B6, PWD oder in F1

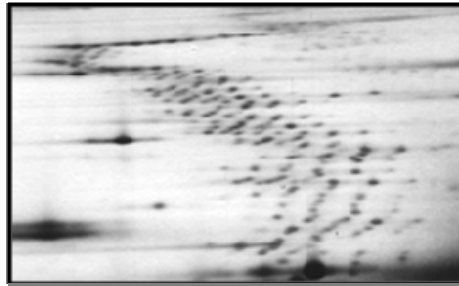


Abbildung 23: Myh6-Gruppe im Proteinmuster. Die Myh6-Gruppe ist im sauren Bereich lokalisiert und besteht aus ungefähr 50 kleinen Proteinspots, welche für sich alle reproduzierbar sind.

3.2.2.2 Vergleich der Proteinmuster abhängig vom Geschlecht

Abbildung 24 zeigt die Anzahl der signifikant veränderten Proteinspots im Vergleich männlicher zu weiblicher konsumischer Mausstämmen. Die durchschnittliche Anzahl an varianten Proteinen lag hierbei bei ungefähr 80 Spots; zwei konsumischen Stämmen, CS12 und CS16 lagen hingegen niedriger (CS12: 17; CS16: 48) (Abbildung 24).

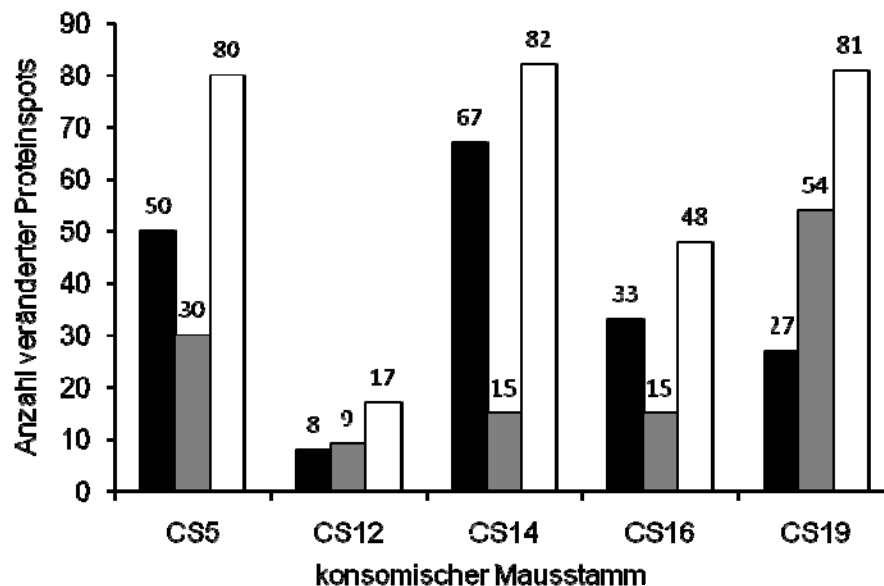


Abbildung 24: Darstellung des Geschlechtervergleichs im Proteinmuster. Weiß gibt die totale Anzahl aller signifikant varianten Spots an, schwarz die hochregulierten und grau die Anzahl aller runterregulierten Proteinspots innerhalb des Vergleiches männlich vs. weiblich.

Wurden nun die veränderten Spots auf ihre Regulierung betrachtet, war zu erkennen, dass in den konsumischen Mausstämmen eine vermehrte Überexpression der männlichen Proteine vorkam. Die Ausnahmen stellten hierbei CS12 und CS19 dar. CS12 zeigte ein Gleichgewicht und CS19 eine Überexprimierung der Proteine in den Weibchen (Abbildung 24).

3.2.3 Klassifizierung der geschlechtsspezifischen Proteinspots der konsumischen Stämme

Wie oben bereits beschrieben, wurden auch hier die varianten Proteine mittels Datenbank-unterstützten DAVID-Tools in funktionelle Kategorien klassifiziert. Im Folgenden erfolgte die Untersuchung der männlichen Tiere versus der weiblichen Tiere innerhalb der einzelnen konsumischen Stämme.

Tabelle 13: Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere, nach den einzelnen konsumischen Linien getrennt. Proteinveränderungen wurden GO-annotiert (Level 3) in den Kategorien "biologische Prozesse" und "zelluläre Komponenten" sowie sortiert in KEGG-Stoffwechselwege

Funktionelle Kategorie		Variante Proteine (%)* male vs. female				
		CS5	CS12	CS14	CS16	CS19
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	41.4	-	50.0	35.7	44.0
	Aktin Zytoskelett	10.3	-	-	-	-
	Kontraktile Fasern	-	-	-	-	12.0
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	33.3	-	31.3	45.5	36.4
KEGG	Oxidative Phosphorylierung	24.1	-	25.0	-	12.0
	Kardiale Muskelkontraktion	20.0	-	-	-	12.0

*100%: identifizierte, variante Proteine im Vergleich male vs. female

Wie schon in den konsumischen Vergleichen dargestellt, zeigten sich vor allem in den Mitochondrien (ca. 42%) aber auch in den daraus resultierenden Energiemetabolismen (ca. 36.6%) geschlechtsspezifische Unterschiede. Der konsumische Stamm CS12 zeigte generell keinerlei geschlechtsrelevanten Unterschiede (Tabelle 13). Geschlechterunterschiede der kardialen Funktionen, wie Muskelkontraktion, offenbarten sich in den Stämmen CS5 und CS19, nicht aber in CS14. CS14 wiesen in diesen Merkmalen nur Veränderungen im Vergleich gegen B6 auf.

3.2.4 Alpha-1-antitrypsin: das bekannte geschlechts-spezifische Protein

Nach der 2-DE-Auftrennung der Proteine konnten sowohl in allen konsomischen Stämmen als auch in den parentalen Stämmen eine Proteingruppe beobachtet werden, die im Vergleich männlicher und weiblicher Individuen signifikant unterschiedlich waren. Nach der Identifizierung der Proteinspots konnten diese als Alpha-1-antitrypsin mit deren Isoformen Alpha-1-antitrypsin 1-1, 1-4 und 1-5 benannt werden (Abbildung 25).

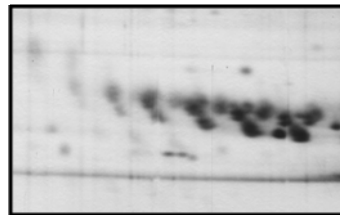


Abbildung 25: Darstellung des Proteins Alpha-1-antitrypsin mit deren Isoformen. Alpha-1-antitrypsin ist im sauren Bereich lokalisiert und unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) in allen männlichen und weiblichen sowohl parentalen als auch konsomischen Tieren.

3.2.5 Testen der alterierenden Proteine von Proteingemischen auf ihre Signifikanz

Nach der zweidimensionalen Auftrennung der Herzproben und Identifizierung der aufgetrennten Proteine, gab es Proteingemische, die gesondert behandelt werden mussten. Aufgefallen war ein Protein-Gemisch, welches in allen Stämmen detektiert wurde. Mit Hilfe der Western Blot Methode konnten die Gemische entschlüsselt und deren Regulierung analysiert werden. Die zu untersuchenden Proteine waren Heat shock protein 60 kDa (Hsp60), Proteindisulfidisomerase (PDI) und beta Tubulin (Tubb2c). Nach Überprüfung des Gemisches stellte sich heraus, dass die zu untersuchenden Proteine nur zum Teil in den konsomischen Stämmen unterschiedlich exprimiert waren. Die Gemische waren zwar dekodiert, aber die Proteine konnten in ihrer Geschlechts-Spezifität nicht bestätigt werden (Abbildung 26).

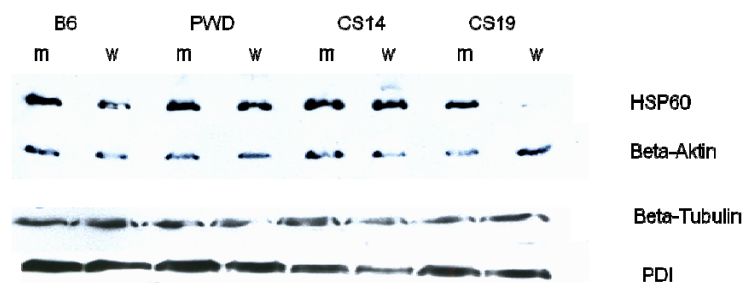


Abbildung 26: Darstellung der Western Blot-Ergebnissen von ausgewählten männlichen und weiblichen konsomischen Stämmen. Auf den ersten Blick war schon erkennbar, dass der Geschlechter-Vergleich für die detektierten Proteine Heat shock protein 60kDa (Hsp60), Beta-Tubulin, und Proteindisulfidisomerase (PDI) nicht signifikant verändert waren. Beta-Aktin diente als Kontrolle.

3.2.6 Testen der Abhängigkeit zwischen den Proteinen, den Genen/Chromosom sowie den Genen mit SNPs/Chromosom in männlichen und weiblichen konsomischen Stämmen

Generell konnten die Proteine in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen cis-Proteine, die auf dem konsomischen Chromosom (CC) lokalisiert sind, zum anderen die trans-Proteine, die nicht auf dem CC kartierten. Allerdings war die Anzahl der cis-Proteine so gering, dass diese als statistisch irrelevant betrachtet und in den folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden.

Beim Vergleich der B6 und PWD Stämme waren zwischen den einzelnen Chromosomen SNPs vorhanden. Um zu testen, inwieweit diese SNPs mit den quantifizierten Proteinveränderungen in Korrelation standen, erfolgten hierfür Vergleiche innerhalb der folgenden Gruppen: Anzahl der Gene/Chromosom (Gene/Chr), Anzahl der Gene mit SNP/Chromosom (SNP/Chr) und Anzahl veränderter Proteine/CS (Proteine/CS). Sowohl Gene/Chr als auch SNPs/Chr wurden von der Datenbank „Mouse Genome Informatics“ (MGI) von Jackson Laboratory (www.informatics.jax.org) herangezogen. Alle drei Parameter wurden miteinander in Korrelation gesetzt.

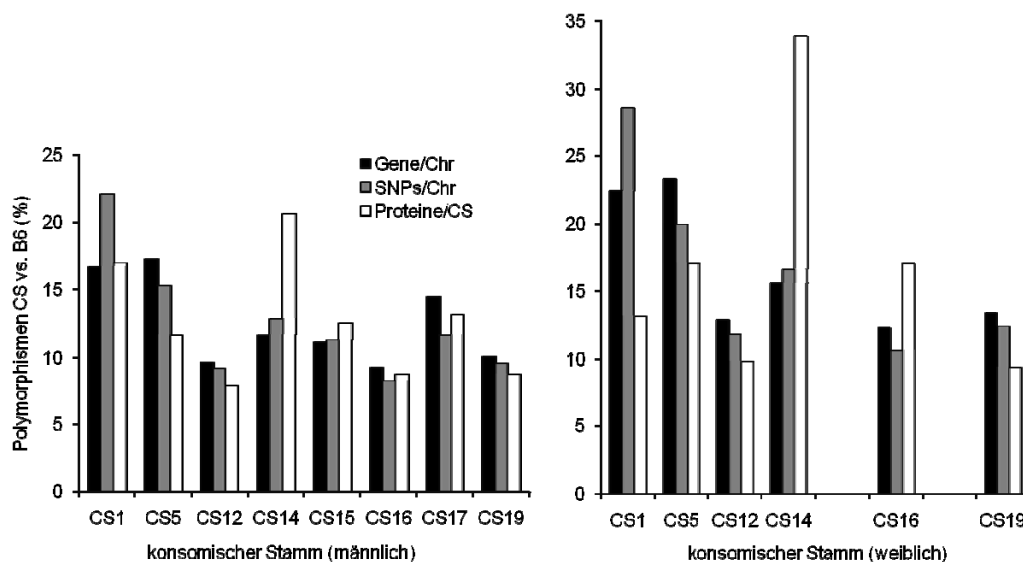


Abbildung 27: Darstellung der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in männlichen (A) und weiblichen (B) konsomischen Stämmen. Hierbei stellen die schwarzen Säulen die Gene/Chr., die grauen Säulen die Gene mit den SNPs/Chr. und die weißen Säulen alle varianten Proteine dar.

Bei deskriptiver Darstellung (Abbildung 27) ist zu erkennen, dass bei ansteigender Anzahl der Gene/Chr. ebenfalls die Anzahl der SNPs/Chr. sowie die Anzahl der varianten Proteine

anstieg. Diese Beobachtungen konnten vorwiegend in den männlichen Tieren und zu geringeren Teilen in den weiblichen Tieren gemacht werden. Abweichend davon waren in den varianten Proteinen sowohl in den männlichen (Tabelle 24) als auch in den weiblichen Mäusen CS14 (Tabelle 25).

Darüberhinaus wurde die Abhängigkeit der Anzahl der Gene mit der Länge der Chromosomen getestet (Daten nicht gezeigt). Zu Prüfen galt: umso länger die Chromosomen, umso mehr Gene auf diesen Chromosomen und resultierend dadurch höhere SNP-Level sowie Proteinvarianten. Diese Korrelationen trafen nicht zu: so besaß z.B. das ca. 95 Millionen Basenpaar lange Chromosom 17 eine höhere Anzahl an Genen/Chr. (14,5%) als Chromosom 12 (9,6%), welches ca. 121 Millionen Basenpaare umfasste.

Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen die unterschiedlichen bivariaten Streudiagramme in männlichen und weiblichen Stämmen. So zeigten bei männlichen Tieren die Anzahl der Gene/Chr sowie die Anzahl der SNPs/Chr eine hohe signifikante Korrelation miteinander ($r=0,0838$; $p=0,009$). Ein Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,702$, gibt an, dass bei steigender Anzahl der Gene/Chr, ebenfalls die Anzahl der SNPs/Chr zunahm. Die Proteine/CS korrelierten hingegen nicht mit den SNPs/Chr sowie nicht mit den Genen/Chr (Abbildung 28). Resultierend daraus stand die Anzahl der varianten Proteine nicht in statistischer Abhängigkeit mit der Anzahl der Gene/Chr. bzw. SNPs/Chr.

Abbildung 29 zeigt die bivariaten Streudiagramme der weiblichen Stämme. Hierbei war zu erkennen, dass keine Korrelationen der veränderten Proteine gegenüber den Genen/Chr ($r=0,053$) sowie gegenüber den SNPs/Chr ($r=0,064$) bestand. Die Gene/Chr korrelierten auch in diesem Fall mit den SNPs auf Genen/Chr ($r=0,88$; $p<0,05$), da diese von den Geschlechtern unabhängig waren.

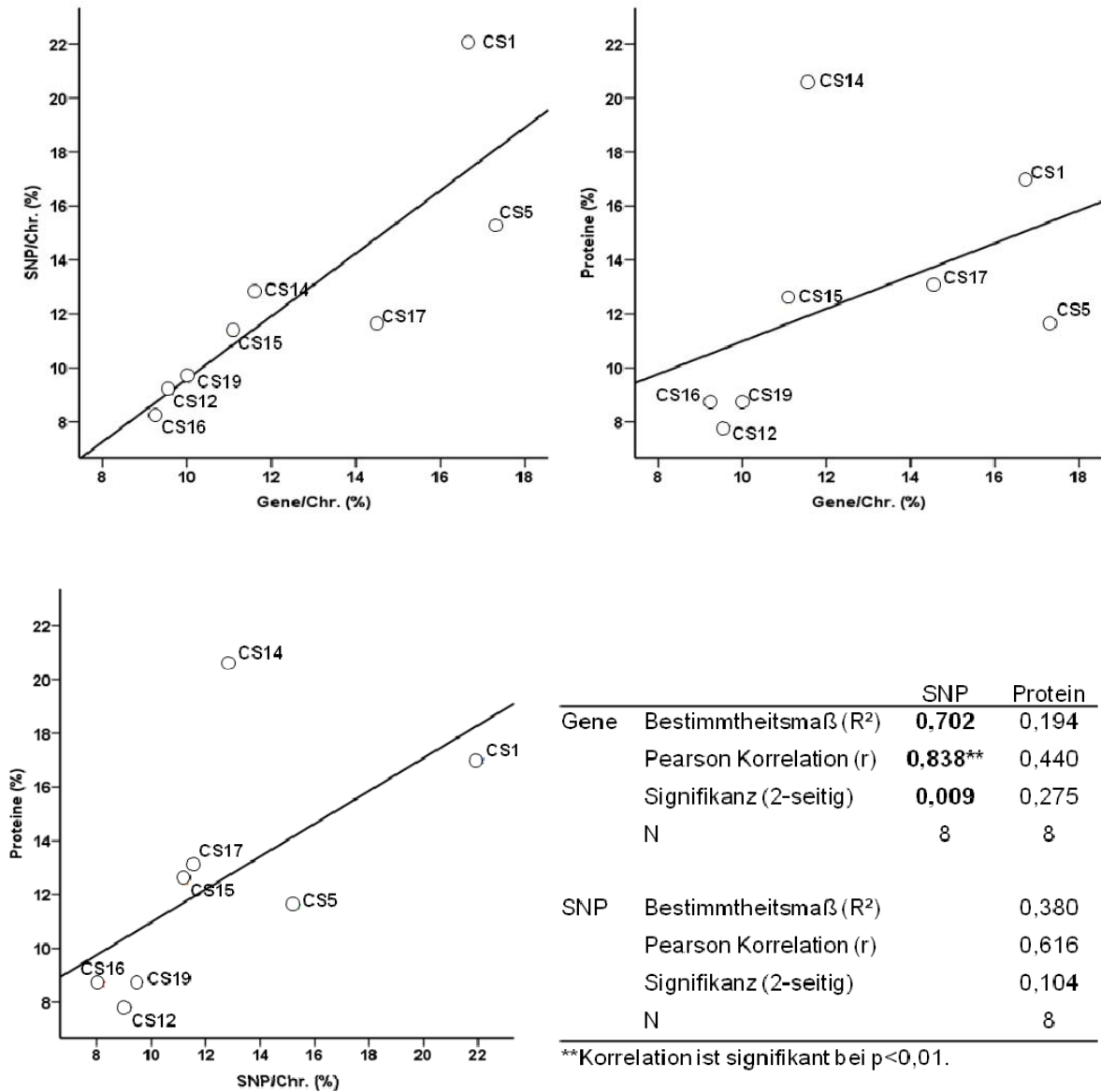
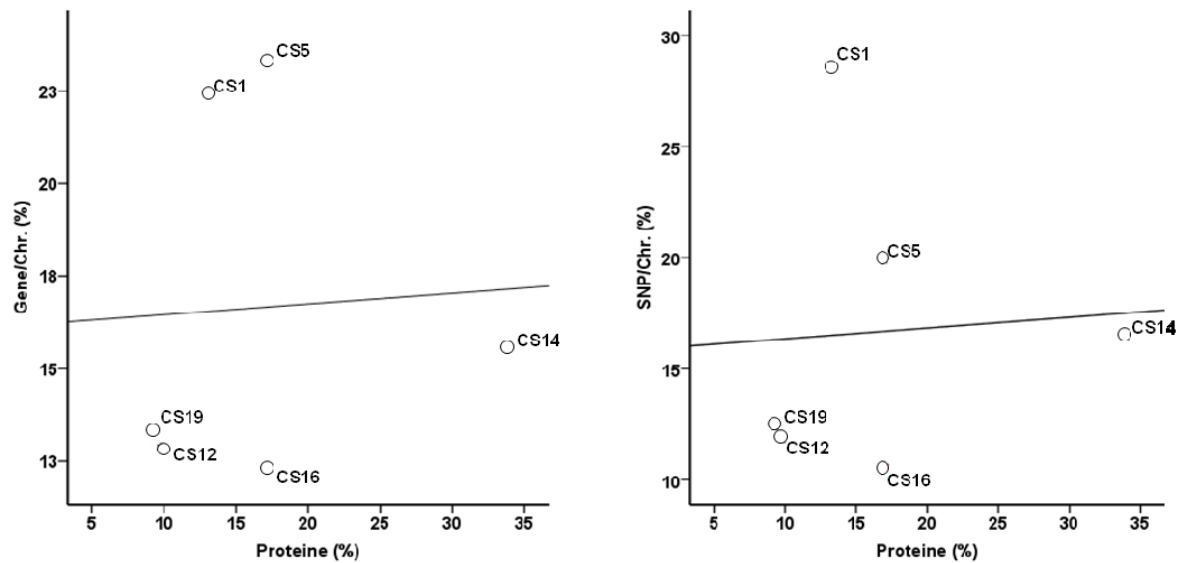


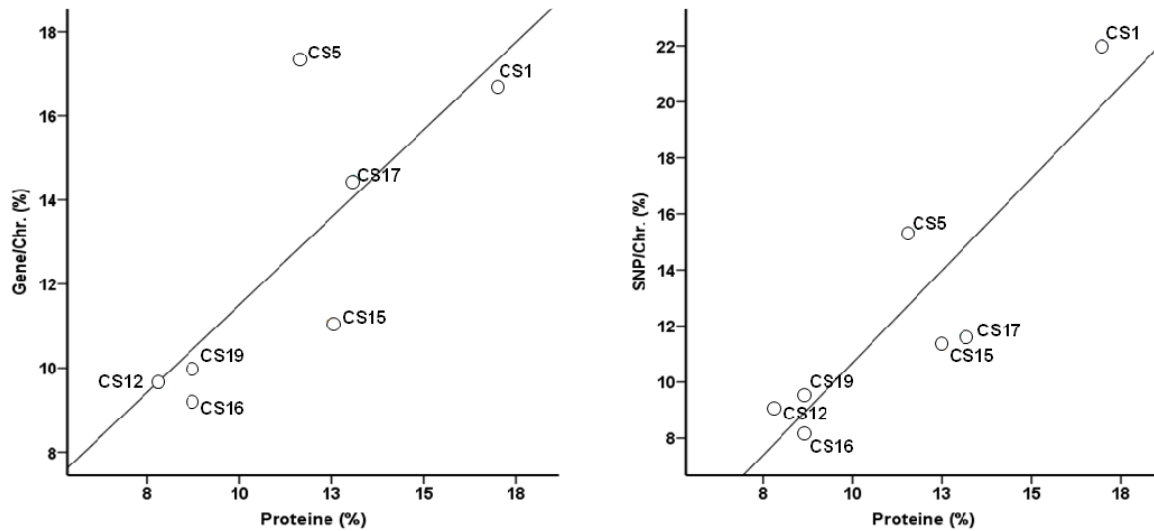
Abbildung 28: Korrelation der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in männlichen konsumischen Stämmen. Die Streudiagramme zeigen den Korrelationsgrad zwischen den einzelnen zu untersuchenden Faktoren an, wobei die Anzahl jeweils von links nach rechts und unten nach oben ansteigt. Die kolorierten Sterne stellen die konsumischen Linien dar. Ebenfalls wurde der Bestimmtheitsmaß R² und der Korrelationskoeffizient r kalkuliert, welche in der Tabelle mit den entsprechenden Signifikanzen dargestellt wurden.



		Gene	SNP
Proteine	Bestimmtheitsmaß (R^2)	0,003	0,004
	Pearson Korrelation (r)	0,053	0,064
	Signifikanz (2-seitig)	0,621	0,903
	N	6	6

Abbildung 29: Korrelation der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in weiblichen konsumischen Stämmen. Die Streudiagramme zeigen den Korrelationsgrad zwischen den einzelnen zu untersuchenden Faktoren an, wobei die Anzahl jeweils von links nach rechts und unten nach oben ansteigt. Die kolorierten Sterne stellen die konsumischen Linien dar. Ebenfalls wurde der Bestimmtheitsmaß R^2 und der Korrelationskoeffizient r kalkuliert, welche in der Tabelle mit den entsprechenden Signifikanz dargestellt wurden.

Aufgrundessen, dass die Proteine sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Tieren Abweichungen bei CS14 zeigten, wurden die statistischen Analysen nochmals ohne diesen Stamm durchgeführt. Resultierend daraus zeigte sich in den männlichen Tieren eine statistische Abhängigkeit der polymorphen Proteine sowohl gegenüber den Genen/Chr. ($r=0,779$; $p<0,05$) als auch den SNPs/Chr ($r=0,882$; $p<0,01$) (Abbildung 30). In den weiblichen Mäusen blieb die Anzahl der varianten Proteine gegenüber beiden Gruppen, Anzahl der Gene/Chr. und Anzahl der SNPs/Chr., statistisch unabhängig (Daten nicht gezeigt).



Proteine	Bestimmtheitsmaß (R ²)	Gene	SNP
		0,607	0,779
	Pearson Korrelation (r)	0,779*	0,882**
	Signifikanz (2-seitig)	0,039	0,009
	N	6	6

*Korrelation ist signifikant bei $p < 0,05$.

**Korrelation ist signifikant bei $p < 0,01$.

Abbildung 30: Korrelation der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in männlichen konsomischen Stämmen ohne CS14. Die Streudiagramme zeigen den Korrelationsgrad zwischen den einzelnen zu untersuchenden Faktoren an, wobei die Anzahl jeweils von links nach rechts und unten nach oben ansteigt. Die kolorierten Sterne stellen die konsomischen Linien dar. Ebenfalls wurde der Bestimmtheitsmaß R^2 und der Korrelationskoeffizient r kalkuliert, welche in der Tabelle mit den entsprechenden Signifikanzen dargestellt wurden.

3.2.7 Beziehung der varianten mRNAs zur Anzahl der SNPs und der Anzahl der Gene

Die Messungen der mRNA-Level erfolgte für die männlichen Stämme mittels „new generation sequencing“ am MPI (Berlin). Die Einteilung der varianten mRNAs fand in zwei Gruppen statt: cis-mRNAs, welche auf dem CC kartierten und trans-mRNAs, die auf den B6 Chromosomen kartierten.

Abbildung 31 zeigt, dass bei steigender Anzahl der Gene/Chr., auch die Anzahl der varianten cis-mRNAs zunahm. Nur bei CS5 wichen diese mRNAs stark nach oben hin ab. Die trans-mRNAs zeigten diese Abhängigkeiten nicht. Wie bei den Genen/Chr. konnte auch beim Vergleich der SNPs/Chr mit cis- bzw. trans-mRNAs diese Beobachtung festgestellt werden. Nahm die Anzahl der SNPs/Gen zu, nahm auch die Anzahl der cis-mRNAs zu und umgekehrt. Die trans-mRNAs zeigten diesen Verlauf nicht (Abbildung 31).

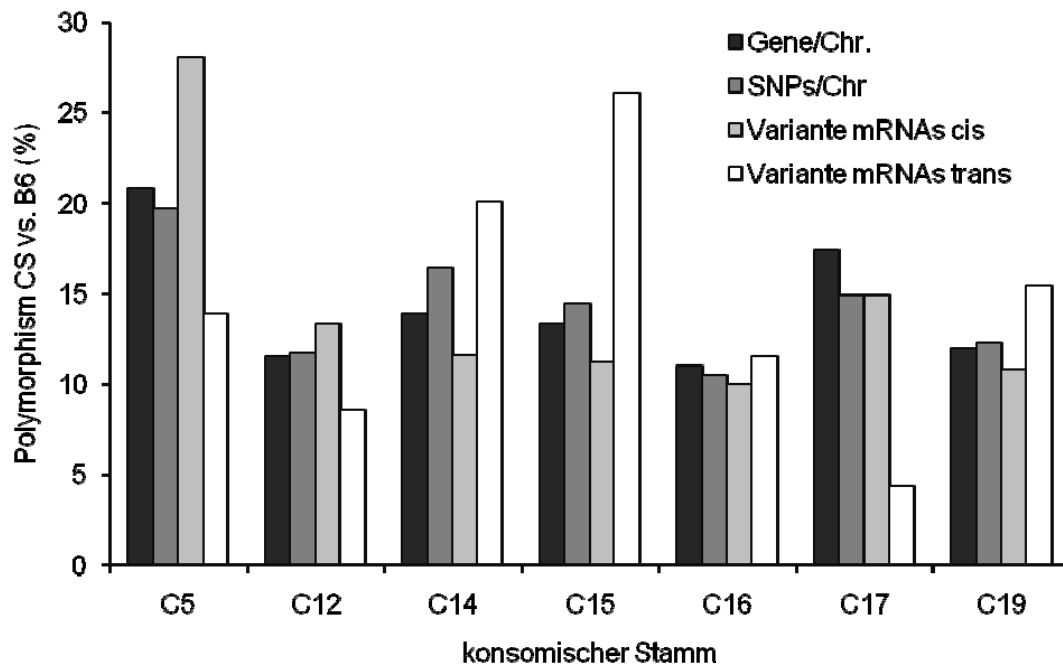


Abbildung 31: Darstellung der prozentualen Werte der varianten mRNAs in den männlichen konsomischen Linien. Hierbei stellen die schwarzen Säulen die Gene/Chr., die dunkelgrauen Säulen die Gene mit den SNPs/Chr., die hellgraue Säule die varianten cis-mRNAs und die weißen Säulen die varianten trans-mRNAs dar.

Um mögliche Zusammenhänge der zu untersuchenden Gruppen zu bestimmen, wurden diese ebenfalls statistisch überprüft. Es konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der varianten cis-mRNAs sowohl mit der Anzahl der Gene/Chr. ($r=0,89$; $p<0,01$) als auch mit der Anzahl der SNPs/Chr. ($r=0,79$; $p<0,5$) festgestellt werden. Das Bestimmtheitsmaß R^2 war in beiden Fällen positiv, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass bei steigender Anzahl der Gene/Chr. bzw. der SNPs/Chr. ebenfalls die Anzahl der varianten cis-mRNAs anstieg. Die trans-mRNAs korrelierten hingegen mit keinen der zu untersuchenden Parametern (Abbildung 32).

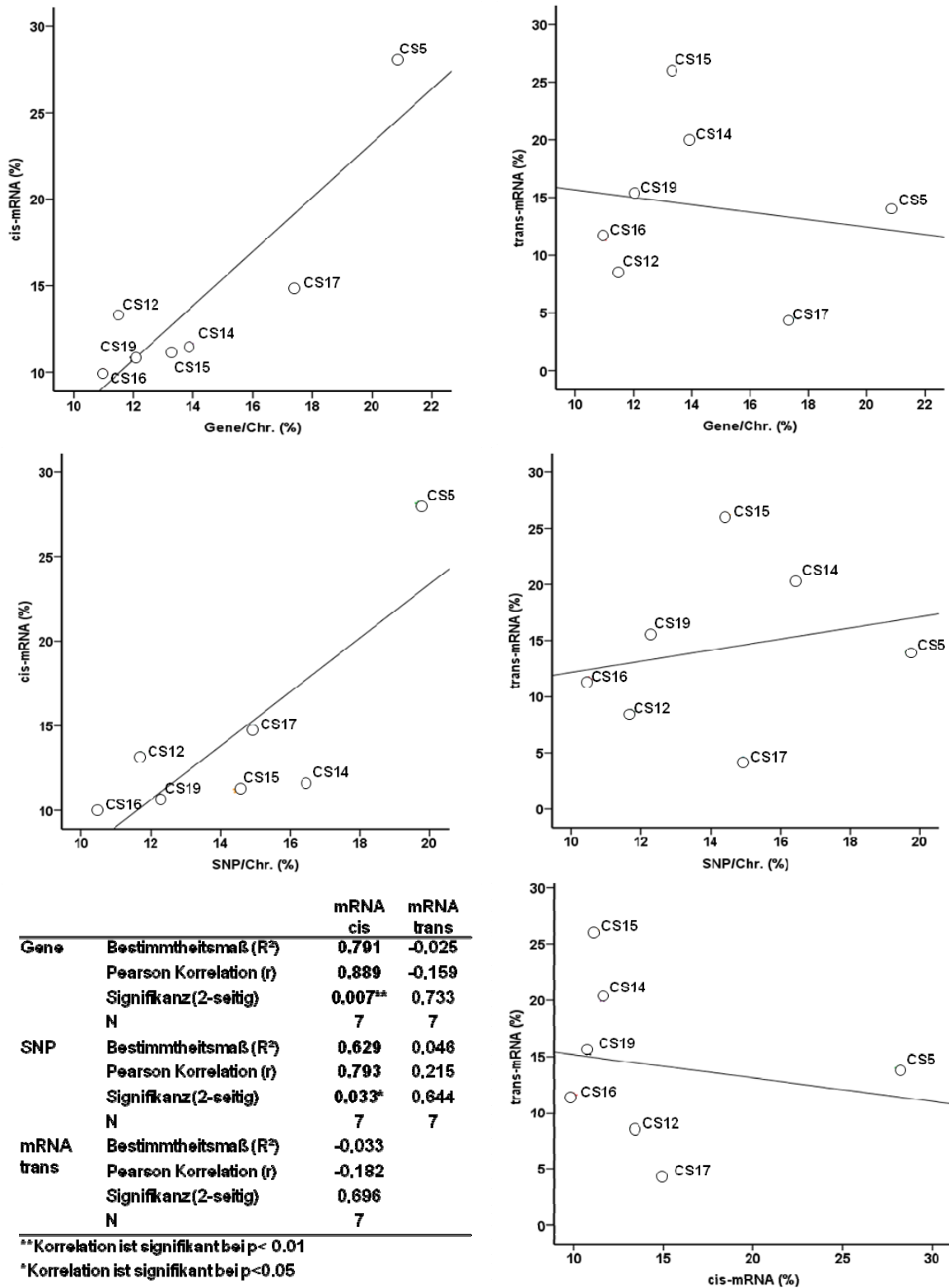
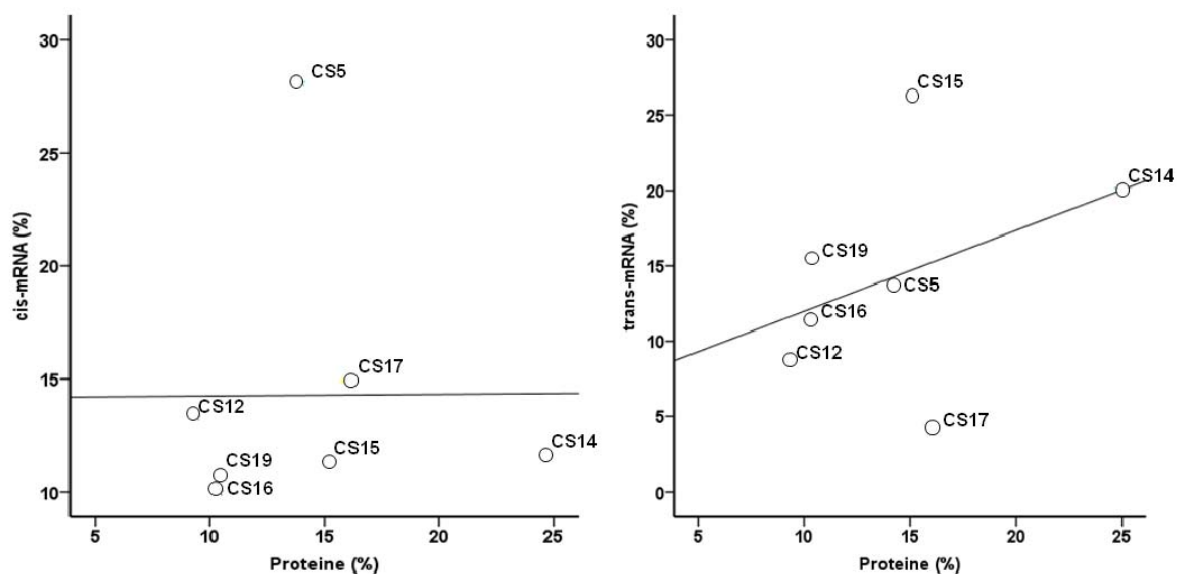


Abbildung 32: Korrelation der Gene/Chr., SNPs, mRNA (cis) und mRNA (trans) in männlichen Tieren. Das Streudiagramm zeigt den Korrelationsgrad zwischen den einzelnen zu untersuchenden Faktoren an, wobei die Anzahl jeweils von links nach rechts und unten nach oben ansteigt. Die kolorierten Sterne stellen die konsomischen Linien dar. Ebenfalls wurde der Bestimmtheitsmaß R² und der Korrelationskoeffizient r kalkuliert, welche in der Tabelle mit den entsprechenden Signifikanzen zu erkennen ist.

3.2.8 Beziehung der Proteine zwischen den cis- und trans-mRNAs

Beim Vergleich der varianten Proteine mit den varianten mRNAs war zu erkennen, dass diese miteinander sowohl in cis- als auch in trans-Richtung nicht korrelierten. Es zeigte sich allerdings eine höhere Abhängigkeit zwischen der Anzahl der varianten Proteinen mit der Anzahl der trans-mRNAs ($r=0,39$) als mit der Anzahl der varianten cis-mRNAs ($r=0,006$), da die Proteine/CS hauptsächlich trans-gerichtet waren. Cis-gerichtete Proteine waren kaum detektiert worden. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch diese Korrelation nicht belegen (Abbildung 33).



		mRNA cis	mRNA trans
Proteine	Bestimmtheitsmaß (R^2)	3,857E-5	0,155
	Pearson Korrelation (r)	0,006	0,394
	Signifikanz (2-seitig)	0,989	0,382
	N	7	7

Abbildung 33: Darstellung der Streudiagramme der mRNA und Proteine in männlichen konsumischen Stämmen. Das Streudiagramm zeigt den Korrelationsgrad zwischen den einzelnen zu untersuchenden Faktoren an, wobei die Anzahl jeweils von links nach rechts und unten nach oben ansteigt. Die kolorierten Sterne stellen die konsumischen Linien dar. Ebenfalls wurde der Bestimmtheitsmaß R^2 und der Korrelationskoeffizient r kalkuliert, welche in der Tabelle mit den jeweiligen Signifikanzen zu erkennen ist.

3.3 Induzierte Hypertrophie in männlichen und weiblichen CS14- und B6-Mäusen

Nach einem Screening der konsomischen Mäuse trat ein Stamm besonders hervor. Sowohl männliche als auch weibliche CS14-Tiere zeigten bedeutend mehr Unterschiede im Proteinmuster als andere CS. Nach der Identifizierung und Klassifizierung der veränderten Proteine der CS14 wurden funktionelle Proteingruppen festgestellt, die für die Myokardhypertrophie von Interesse sein könnten. An diesen Mäusen sowie den B6-Mäusen wurden daraufhin die Hypertrophie durch transversale Aortenstose (TAC) bzw. Kontrolloperationen (Sham) induziert. Um den Krankheitsverlauf der Tiere zu protokollieren, erfolgte die Untersuchung deren Phänotypen mittels Echokardiographen einen Tag präoperativ und 2, 4, 6 sowie 9 Wochen postoperativ. Nach 9 Wochen fand die Tötung der Mäuse durch Genickbruch statt. Die Herzen wurden entnommen, schockgefroren und für die Proteom-Untersuchungen aufgearbeitet wurden. Im Anschluß folgte die zweidimensionale elektrophoretische Auftrennung mit der Evaluierung der Proteinexpressionsmuster und der massenspektrometrischen Identifizierungen der varianten Proteine.

3.3.1 Vergleich der Phänotypen zwischen B6 und CS14 vor der Hypertrophieentwicklung

Bevor die Induktion der Myokardhypertrophie erfolgte, wurden die Tiere mittels Echokardiographie auf ihren Phänotypen hin untersucht (siehe Kapitel 3.1.1).

Tabelle 14 zeigt die signifikanten Veränderungen zwischen den CS14-Mäusen und den B6-Mäusen. Die männlichen CS14-Mäuse zeigten insgesamt ein signifikant größeres Herz als die männlichen B6-Tiere. Signifikant vergrößert waren hierbei: IVSd, IVSs sowie LVPWd, LVPWs und LVM/KG. Auch waren die männlichen CS14-Tiere im gesamten Körpergewicht schwerer als die männlichen B6. Beim Vergleich der weiblichen CS14 gegenüber den weiblichen B6 waren die Unterschiede nicht ganz so deutlich. Hier zeigte sich das vergrößerte Herz nur bedingt in folgenden Parametern: IVSd und LVPWd waren signifikant größer und LVIDd signifikant verringert im Vergleich zu den weiblichen B6-Tieren.

Neben den größeren Herzen der CS14-Tiere gegenüber den B6-Tieren konnten innerhalb der CS14 geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden. Männliche CS14-Tiere zeigen signifikant größere Herzen als die weiblichen CS14-Tiere. Dieser Unterschied war in allen Parametern, die die Struktur des Herzens betrafen zu sehen: IVSs, IVSd, LVIDs, LVIDd, LVPWs und LVPWd (Tabelle 14).

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung des Körpergewichtes (KG), der Herzrate (HR), der Vorderwände (IVSs und IVSd), der Hinterwände (LVPWs und LVPWd), des intraventrikulären Diameter (LVIDs und LVIDd), der linken Ventrikelmasse in Bezug auf das Körpergewicht (LVM/KG), der Ejektionsfraktion (EF) und dem Differentialkoeffizienten (Th/r) in CS14 männlicher und weiblicher Mäuse. * $p < 0,05$ bei CS14 vs. B6, # bei männlich vs. weiblich.

	C57BL/6		CS14	
	male	female	male	female
KG (mg)	20,7 ± 1,29	19,2 ± 1,04	23,85 ± 0,48*	19,51 ± 0,44 [#]
HR (beats/min)	442,6 ± 68,68	430,3 ± 42,37	407,25 ± 14,29	417,21 ± 10,43
IVSs (mm)	0,8 ± 0,09	0,8 ± 0,10	1,01 ± 0,02*	0,92 ± 0,02*, [#]
IVSd (mm)	0,6 ± 0,08	0,7 ± 0,10	0,84 ± 0,02*	0,72 ± 0,01 [#]
LVPWs (mm)	0,8 ± 0,11	0,9 ± 0,18	1,01 ± 0,02*	0,91 ± 0,01 [#]
LVPWd (mm)	0,6 ± 0,09	0,7 ± 0,10	0,85 ± 0,01*	0,73 ± 0,01*, [#]
LVIDs (mm)	3,3 ± 0,25	3,1 ± 0,33	2,89 ± 0,16	2,71 ± 0,09 [#]
LVIDd (mm)	4,1 ± 0,24	4,0 ± 0,36	3,82 ± 0,11	3,66 ± 0,07*, [#]
LVM/KG	4,2 ± 0,60	5,1 ± 0,75	4,90 ± 0,15*	4,55 ± 0,15
EF (%)	42,4 ± 4,95	46,3 ± 7,10	49,25 ± 4,13	51,61 ± 2,20
Th/r	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,07	0,22 ± 0,01*	0,20 ± 0,00 [#]

3.3.2 Bestimmung der phänotypischen Merkmale während der Hypertrophieentwicklung der CS14-Mäuse

Eine erfolgreiche Induktion der TAC zeigte pathologische Veränderung des Herzens. Das scheinoperierte Herz wies eine normale Morphologie mit einer apikalen Form auf, während das Herz nach der 9-wöchigen TAC-Induktion diese Form verloren hatte und zeitgleich an Größe zunahm.

Um die Hypertrophieentwicklung zu untersuchen waren mehrere Faktoren von Interesse. Zum einen das Herzgewicht, welches über das Auswiegen erfolgte, zum anderen die durch Kalkulation ermittelte linksventrikuläre Masse durch Echokardiographie. Tabelle 15 zeigt

eine Übersicht über Körpergewichte, Herzgewichte und Tibialängen der einzelnen Gruppen. Die Herzgewichte zeigten zwar eine Gewichtszunahme bei den TAC-induzierten Tieren, allerdings konnten diese nach der statistischen Signifikanzprüfung nicht als signifikant erkannt werden, was u.a. auf die Organ-Präparation zurückzuführen war. Über diesen Parameter konnte dementsprechend keine Aussage über die Hypertrophieentwicklung getroffen werden.

Aus diesem Grund war die Kalkulierung des zweiten Parameters, der linksventrikulären Masse (LVM) umso entscheidender. Die LVM wurde durch die Messung von Wanddicke und Durchmesser des linken Ventrikels berechnet und zur Bestimmung der Hypertrophieentwicklung auf die Tibialänge normalisiert. Ein weiterer Parameter für die Normalisierung kann das Körpergewicht sein, welches jedoch geschlechtsbedingt und durch mögliche Komplikationen beim Eingriff, zu erheblichen Schwankungen führen kann. Die Tibialänge hingegen ist ein relativ konstanter Faktor. Sie fungiert als Index für das Wachstum und ist unabhängig von Körpergewicht, Fettanteil, Muskelmasse und Flüssigkeitshaushalt. (Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht der Körpergewichte und Herzgewichte nach 9 Wochen. M= männlich; W=weiblich; Sham= scheinoperiert; TAC= transversale Aortenkonstriktion; * p<0,05 Männlich vs. Weiblich

Gruppe	Körpergewicht (g)	Herzgewicht (g)	Tibialänge (mm)
MB6Sham	28,84±1,89*	133,30±11,9	17,31±0,48
WB6sham	23,22±1,77	113,25±6,25	18,33±0,65
MB6TAC	27,73±1,69*	149,45±18,21	17,23±0,38
WB6TAC	22,82±0,61	122,67±8,99	17,69±0,86
MCS14Sham	29,73±1,09*	122,35±1,9	17,33±0,46
WCS14Sham	23,54±1,80	107,96±10,38	17,84±0,30
MCS14TAC	27,73±2,21*	120,00±4,76	18,03±0,32
WCS14TAC	23,62±1,70	128,68±18,69	18,01±0,92

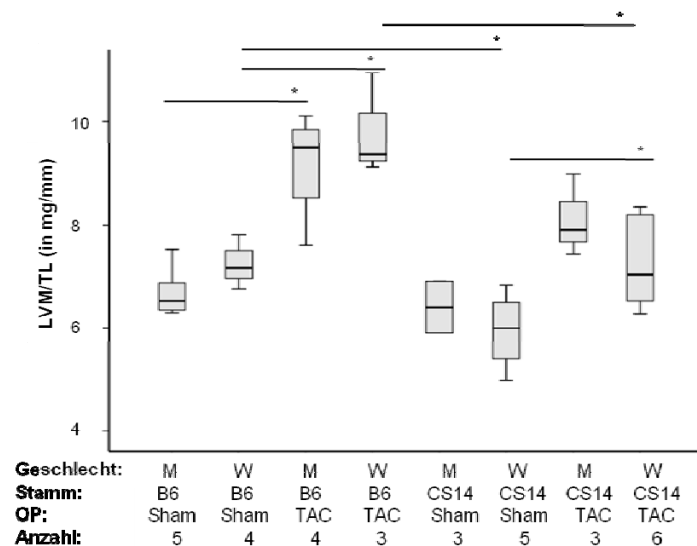


Abbildung 34: Darstellung der LVM/TL (in mg/mm) nach 9 Wochen TAC-Induktion. Deutlich zu erkennen war die signifikante Zunahme der linken Ventrikelmasse in Bezug auf die Tibiallänge (LVM/TL) nach einer 9-wöchentlichen Versuchsdauer sowohl in männlichen (M) B6 als auch in weiblichen (W) B6 und CS14. * $p < 0,05$.

Generell konnte gezeigt werden, dass neun Wochen postoperativ sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Sham- sowie TAC-Tieren die B6-Mäuse jeweils höhere LVM/TL zeigten als die CS14-Mäuse. In den weiblichen Tieren sogar signifikant. Neun Wochen nach der TAC-Induktion konnten sowohl bei männlichen B6 als auch bei weiblichen B6 und weiblichen CS14 eine signifikante Zunahme der LVM/TL gegenüber den Sham-Tieren beobachtet werden. Bei männlichen CS14-Mäusen war eine signifikante Zunahme nicht gegeben. Die LVM/TL-Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tiere waren sowohl bei CS14 als auch bei B6 nicht signifikant. (Abbildung 34).

3.3.2.1 Bestimmung der Ejektionsfraktion bei Myokardhypertrophie

Mittels Echokardiogramm können Parameter, wie die Ejektionsfraktion (EF) bestimmt werden. Die EF gibt die prozentuale Auswurfsfraktion vom enddiastolischen Volumen des linken Ventrikels an, welches dem maximalen Volumen entspricht. Dieser Parameter charakterisiert eine klinisch relevante Einflussgröße der systolischen Funktion und ist sowohl von der Vor- als auch von der Nachlast des Volumens abhängig.

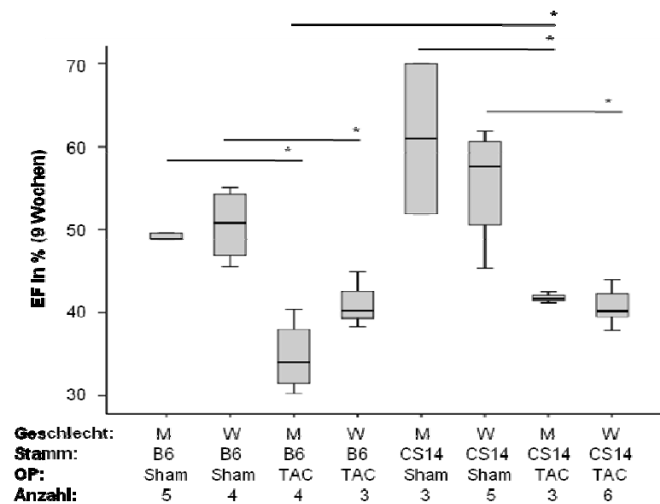


Abbildung 35: Darstellung der EF in %, 9 Wochen nach Induktion der Hypertrophie in männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen. Die Ejektionsfraktion sinkt nach 9-wöchiger transversaler Aortenkonstriktion (TAC) signifikant gegenüber den Kontrolltieren (Sham) an. Geschlechterunterschiede sind nicht vorhanden. * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$.

Neun Wochen nach der Hypertrophie-Induktion war im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren sowohl in CS14- als auch in B6-Mäusen ein signifikanter Funktionsverlust der EF in männlichen und weiblichen Mäusen zu verzeichnen. Die EF betrug in den männlichen und weiblichen scheinoperierten B6-Tieren ca. 50% und in den männlichen und weiblichen CS14-Mäusen ca. 53%; nach der TAC-Induktion sank die EF auf 35% in den männlichen sowie auf 41% in den weiblichen B6-Tieren und in männlichen und weiblichen CS14-Mäusen auf ca. 40%. Beim Vergleich der Stämme B6 und CS14 konnte ein signifikanter Unterschied in der EF zwischen männlichen B6 und männlichen CS14 Tieren detektiert werden. Im Gegensatz zu den männlichen B6-Tieren zeigen die männlichen CS14-Mäuse eine bessere EF. Geschlechterunterschiede waren nicht beobachtet worden (Abbildung 35).

3.3.2.2 Zeitlicher Verlauf der Ejektionsfraktion

Anhand des engmaschigen Monitorings der EF vor der Operation und nach 2, 4, 6 und 9 Wochen postoperativ war eine Verlaufskontrolle der Hypertrophie möglich. Die Verlaufskurve wurde nach männlich (Abbildung 36A) und weiblich (Abbildung 36B) unterteilt.

Die EF der scheinoperierten Tiere blieb über den Verlauf der Studie konstant (49-53%). Sechs Wochen nach der induzierten Hypertrophie konnte in beiden Geschlechtern ein signifikanter Abfall der EF beobachtet werden. Es konnten keine signifikanten Geschlechterunterschiede verzeichnet werden.

Wie in Kapitel 3.3.2.1 bereits beschrieben zeigte der Vergleich B6 vs. CS14 signifikante Unterschiede in Woche 9 der männlichen TAC-Tiere. Tendenziell lag die prozentuale EF in CS14-Tieren höher, als in den Kontrolltieren B6. Im Vergleich der weiblichen CS14- und B6-Mäuse konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

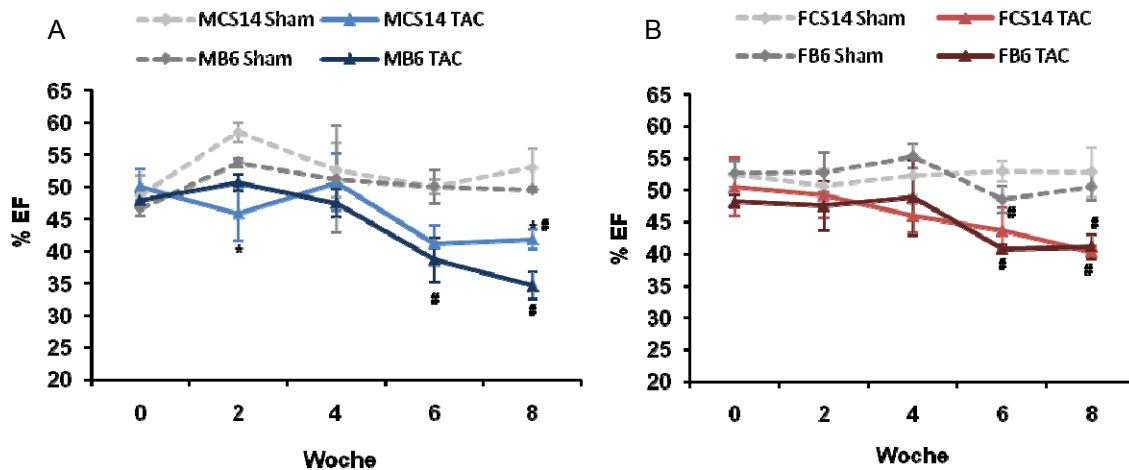


Abbildung 36: zeitlicher Verlauf der EF in % in männlichen (A) und weiblichen (B) Mäusen. Die EF sinkt innerhalb der 9 Wochen im Vergleich der behandelten Tiere (TAC, farbig) gegenüber den Kontrolltieren (Sham, grau) stetig ab, signifikant ab Woche 6. * $p < 0,05$ CS14 vs. B6; # $p < 0,05$ TAC vs. Sham. Geschlechterunterschiede sind keine vorhanden.

3.3.2.3 Bestimmung der Hypertrophie-Form

Als bestimmenden Parameter der Hypertrophie-Form (konzentrisch oder exzentrisch) gilt die relative linksventrikuläre Wanddicke (Th/r), welche durch den Quotient der Werte der diastolischen Hinterwand und dem diastolischen Intradiameter kalkuliert wurde. Als physiologisch normal gilt ein Th/r von 0,33. Sinkt dieser Wert, liegt ein Anzeichen einer exzentrischen Hypertrophie vor, steigt der Wert, existiert eine konzentrische Hypertrophie.

In der neunten Versuchswoche zeigten alle TAC-Tiere (mit Ausnahme der weiblichen CS14) eine signifikante Steigerung der linksventrikulären Wanddicken. Allgemein konnte festgehalten werden, dass die CS14-Mäuse tendenziell in ihrer Th/r geringer lagen als die Kontroll-Mäuse und somit scheinbar weniger zur konzentrischen Hypertrophie neigten (Abbildung 37).

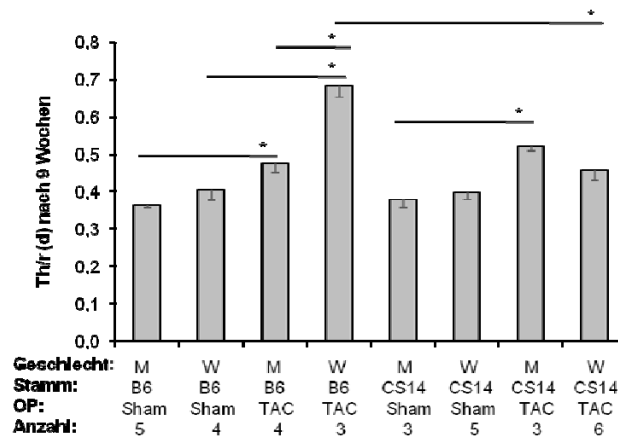


Abbildung 37: Darstellung der relativen Wanddicke (Th/r) nach 9 Wochen transversaler Aortenkonstriktion (TAC). Die relative Wanddicke steigt innerhalb der induzierten Tiere gegenüber der Kontrolltiere (Sham) nach 9 Wochen Behandlung an. * für $p < 0,05$.

3.3.3 Vergleich der Proteinmuster neun Wochen nach der TAC-Induktion

Nach dem Verfahren der Proteinquantifizierung erfolgten ebenfalls die Behandlungen der Herzen der TAC-Tiere und deren Kontrollen.

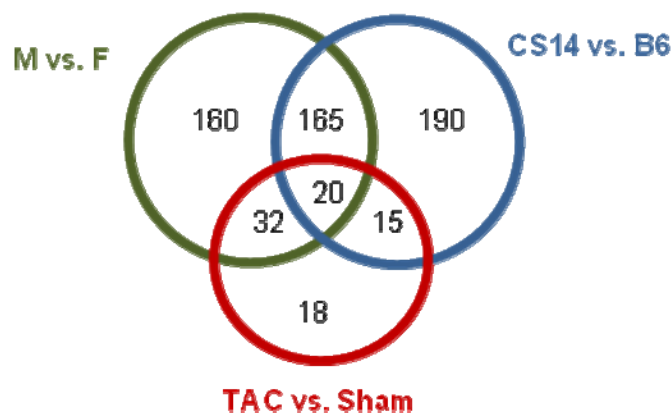


Abbildung 38: Darstellung der signifikant ($p < 0,05$) veränderten Proteine im Krankheitsmodell. Das Kreisdiagramm zeigt die Anzahl der signifikant ($p < 0,05$, multifaktorielle ANOVA, postHoc: Tukey B-Test) veränderten Proteinspots in unterschiedlichen Vergleichen: der Stämme (blau), des Geschlechts (grün) und der induzierten Krankheit (rot). Die Schnittmengen zeigen die Proteinspots, die von mehreren Faktoren abhängig sind.

Mit Hilfe von der multifaktoriellen ANOVA wurde das Auftreten funktionell unterschiedlicher Proteingruppen zwischen den Geschlechtern, zwischen den CS14- und B6-Linien, zwischen Sham und TAC sowie zwischen allen drei Faktoren (Geschlecht, TAC und CS) verglichen. Abbildung 38 zeigt die Anzahl der Proteinspots innerhalb der genannten Gruppen. Zu erkennen waren 160 veränderte Proteinspots innerhalb der Vergleiche der Geschlechter

(grün), 190 Proteinspots innerhalb der Vergleiche CS14 und B6 (blau) und 165 Proteinspots innerhalb der Vergleiche männlich vs. weiblich und CS14 vs. B6. Hypertrophie-spezifische Proteinspots, wie der Vergleich TAC vs. Sham (rot) waren dahingegen nur 18 Proteinspots detektiert worden. Bei Betrachtung der Vergleiche innerhalb der Gruppen männlich vs. weiblich und TAC vs. Sham konnten 32 variante Proteinspots detektiert werden und innerhalb der Vergleiche CS14 vs. B6 und TAC vs. Sham 15 signifikant veränderte Proteinspots. Die Schnittmenge aller Vergleiche entsprach 20 Spots.

3.3.4 Klassifizierung der veränderten Proteinspots

Nach der Quantifizierung der Proteinspots wurden die Daten in das DAVID-Analysen Programm eingegeben, um die folgende „Enrichment“-Analysen durchzuführen. Ebenfalls erfolgte die Einteilung der Funktionen in drei Klassen: „zelluläre Komponenten“, „biologische Prozesse“ und „KEGG-Stoffwechselwege“.

Tabelle 16: Klassifizierung der Proteine in funktionelle Kategorien mittels einfaktorier ANOVA. Proteinveränderungen wurden GO-annotiert (Level 3) in den Kategorien „biologische Prozesse“ und „zelluläre Komponenten“ sowie sortiert in KEGG-Stoffwechselwege

Funktionelle Kategorie		Variante Proteine (%)*		
		Geschlecht	CS	TAC
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	57.3	53.8	45.0
	Aktin Zytoskelett	10.1	9.7	15.0
	Kontraktile Fasern	10.1	8.6	20.0
	Myosinkomplex	3.4	3.2	10.0
	Z Scheibe	3.4	3.2	15.0
	I Bande	3.4	3.2	15.0
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	50.0	45.0	15.0
	Herzentwicklung	8.9	8.75	-
	Muskelkontraktion	6.4	5.0	-
KEGG	Oxidative Phosphorylierung	12.4	10.8	-
	Zitronensäurezyklus	12.4	6.5	-
	Kardiale Muskelkontraktion	9.0	7.5	-
	Hypertrophie			
	Kardiomyopathie	7.9	7.5	-
	Diletierte Kardiomyopathie	7.9	7.5	-

*100%: identifizierte, variante Proteine im Vergleich male vs. female

Wie schon in den Ergebnissen der unbehandelten Mäuse beschrieben, waren auch hier die Mitochondrien mit dem daraus resultierenden Energiemetabolismus die veränderte Kategorie mit den häufigsten alterierenden Proteinen in allen Vergleichen. Tabelle 16 zeigt den einfaktoriellen Vergleich der ANOVA. Vorallem im TAC-Vergleich war eine erhöhte Involvierung der Proteine im kontraktilem Apparat, die das Aktin Zytoskelett, die kontraktilem Fasern, den Myosinkomplex, die Z Scheiben und die I Banden betrafen, zu erkennen. Interessanterweise ergab die Charakterisierung der Proteine über die KEGG-Stoffwechselwege, eine erhöhte Veränderung der hypertrophen und der dilatierten Kardiomyopathie im Geschlechter- und im CS-Vergleich, nicht aber bei den Gegenüberstellungen der TAC- mit den Sham-Tieren. Diese Resultate beschrieben demnach die unterschiedlichen Regulierungen der Proteine: so waren sowohl Geschlecht- als auch CS-spezifische Proteine in der oxidativen Phosphorylierung, im Zitronensäurezyklus sowie in kardialen Funktionen involviert, welche aber durch die Induktion einer Myokardhypertrophie nicht beeinflusst wurden.

Tabelle 17: Klassifizierung der Proteine in funktionelle Kategorien mittels multifaktorieller ANOVA. Proteinveränderungen wurden GO-annotiert (Level 3) in den Kategorien "biologische Prozesse" und "zelluläre Komponenten" sowie sortiert in KEGG-Stoffwechselwege

Funktionelle Kategorie		Variante Proteine (%)*			
		Geschlecht		Geschlecht	
		CS	TAC	CS	CS
				TAC	TAC
Zelluläre Komponenten	Mitochondrien	53.8	29.4	36.4	35.7
	Kontraktile Fasern	9.0	11.8	-	28.6
	Aktin Zytoskelett	7.7	23.5	-	-
	Myosinkomplex	3.8	11.8	-	-
	Z Scheibe	-	-	-	14.3
	I Bande	-	-	-	14.3
Biologische Prozesse	Energiemetabolismus	44.7	23.0	-	-
	Herzkontraktion	4.5	15.4	-	18.2
	Herzentwicklung	8.9	-	-	-
KEGG	Oxidative Phosphorylierung	9.0	-	-	-
	Zitronensäurezyklus	5.1	11.8	-	-
	Kardiale Muskelkontraktion	7.7	23.5	-	-
	Hypertrophe Kardiomyopathie	6.4	23.5	-	21.4
	Dilatierete Kardiomyopathie	6.4	23.5	-	21.4

*100%: identifizierte, variante Proteine im Vergleich male vs. female

Bei Betrachtung der multifaktoriellen ANOVA war zu erkennen, dass neben den Proteinen in den Mitochondrien auch die Proteine des kontraktilem Apparates eine wichtige Rolle zu

spielen schienen. Diese Proteingruppe war zum Einen Geschlecht- und Hypertrophie-spezifisch, zum anderen aber auch Geschlecht-, CS- und Hypertrophie-abhängig. Eine Detektion von Proteinen, die nur CS- und Hypertrophie-abhängig waren, fiel negativ aus. Zusammengefasst ist zu sagen, dass das Geschlecht auf die Proteinveränderungen während einer Hypertrophie einen größeren Einfluss auszuüben schienen als die CS. Dies bestätigte sich ebenfalls in den KEGG-Stoffwechselwegen. Sowohl Proteine der hypertrophen als auch der dilatierten Kardiomyopathie zeigten eine stärkere Expressionsveränderung, wenn der Geschlechter-Vergleich in Bezug auf die Myokardhypertrophie involviert war (Tabelle 17).

4 DISKUSSION

Für die Geschlechterentwicklung spielen die Chromosomen X und Y eine entscheidende Rolle. Das X-Chromosom liegt im weiblichen Organismus homozygot vor, wodurch eine höhere Anzahl an Geninformationen als in den männlichen Organismen vorliegt, in denen das X-Chromosom nur einmal vorliegt. Durch die Inaktivierung eines X-Chromosoms im weiblichen Körper wird es in seiner Genexpression eingeschränkt [25]. Nur die pseudoautosomalen Gene (Gene, die auf X und Y identisch sind) bleiben dabei erhalten. Auf dem Y-Chromosom ist das *sex-determining region of Y* (SRY)-Gen lokalisiert, welches den Testis-determinierenden Faktor (TDF) codiert. Der TDF fungiert als Transkriptionsfaktor und ist durch die Regulierung verschiedenster Genexpressionen für die entsprechende Gonadenentwicklung verantwortlich. Die geschlechtsspezifischen Hormone Testosteron und Östrogen sind die grundlegenden Faktoren für die Entwicklung der Geschlechtsunterschiede. Sie spielen aber auch eine Rolle in der Regulierung der Gene. Witt et al. konnten in Mäusexperimenten feststellen, dass die mRNA in großem Umfang in ihrer Expression in männlichen und weiblichen Tieren variieren. Auch im Krankheitsmodell der transversalen Aortenstenose konnten sie diese geschlechtsspezifischen Unterschiede auf mRNA-Ebene nachweisen [136]. Der weibliche Organismus kompensiert demnach eine Krankheit auf andere Art und Weise als der männliche Organismus. Auch die Statistik zeigt, dass Frauen bei gleichem Körpergewicht und gleichem Alter zwar seltener an kardiovaskulären Erkrankungen leiden als Männer, aber nach der Menopause ein erhöhtes Erkrankungs-Risiko zeigen. Östrogen wirkt demnach als Schutzmechanismus. Neben den hormonellen Einflussfaktoren dürfen die genetischen Ursachen nicht außer Acht gelassen werden. SNPs können hierbei eine bedeutende Rolle spielen. Je nachdem, in welchem Bereich der SNP sich befindet, kann das synthetisierte Protein in seiner Expression und Struktur beeinflusst werden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll zum Einen gezeigt werden, inwieweit die Gene in Form von Polymorphismen eine Auswirkung auf männliche und weibliche Merkmale haben; zum anderen soll gezeigt werden, inwieweit die Myokardhypertrophie in männlichen und weiblichen Organismen in ihrem Schweregrad und im Verlauf der Krankheit von diesen Polymorphismen beeinflusst werden können. Als Modell wurde das konsomische Mausmodell verwendet. Konsomische Mäusestämme gleichen mit ihrem genetischen Hintergrund den B6-Tieren, in denen jedoch je nach Stamm ein Chromosom von einem anderen Mäusestamm (PWD-Maus) stammt. Konsomische Mäuse wurden durch mehrmaliges Rückkreuzen gezüchtet. Durch die bekannte Anzahl und Art der SNPs zwischen B6 und PWD weisen die CS-Mäuse in ihrer Genetik klar definierte Unterschiede auf. Die Analyse des Proteoms bei männlichen und weiblichen CS sollte zeigen, inwieweit

die Expression einzelner Proteine bei männlichen und weiblichen Mäusen unterschiedlich ist und inwieweit dieser Unterschied von den SNPs verschiedener Chromosomen abhängt. Hierzu wurden Proteomanalysen an den Herzen 11 Wochen alter männlicher und weiblicher CS (CS5, CS12, CS14, CS16 und CS19) sowie an den parental Stämmen (PWD und B6) und deren F1-Generation durchgeführt. Vor diesen Proteomanalysen erfolgte die echokardiographische Untersuchung der parental Stämme sowie eines CS (CS14), um diese Stämme auch hinsichtlich ihrer phänotypischen Merkmale zu analysieren. Hiermit sollte geprüft werden, ob die unterschiedlichen SNPs auf die kardiale Funktion einen Einfluss haben. Von den untersuchten CS wurde ein Stamm, CS14, für das Krankheitsmodell der Myokardhypertrophie gewählt, da dieser Stamm unter allen untersuchten CS die höchste Variabilität der Proteine zeigte. Hierbei wurde die Frage verfolgt, welchen Einfluss das Geschlecht und die Gene auf die Ausprägung der Myokardhypertrophie haben.

4.1 Einfluss von Geschlecht und genetischer Variabilität auf Herzphänotypen von parental Stämmen und CS-Mäusen

Sowohl PWD als auch B6 zählen zu den für die Forschung gezüchteten Maus-Stämmen. Jeder Stamm besitzt unterschiedliche Phänotypen, die sich auch nur im kleinsten Detail unterscheiden können. Bis heute sind über die phänotypischen kardialen Merkmale der PWD/Ph Mäuse in der Literatur wenig bekannt. Anhand der echokardiographischen Ergebnisse konnte deren Morphologie und Physiologie bestimmt und analysiert werden. Diese Untersuchungen waren für den weiteren Verlauf der Studie von besonderem Interesse, da sowohl die morphologischen als auch die physiologischen Gegebenheiten der PWD-Herzen eine Basis für die Proteomanalyse der konsomischen Stämme darstellten. Echokardiographische Untersuchungen der PWD-Mäuse zeigten in dem vorliegenden Projekt sowohl in der Diastole als auch in der Systole eine stärkere Vorderwand und Hinterwand sowie einen kleineren intraventrikulären Diameter als B6-Tiere. Resultierend aus diesen Befunden ergab sich in den PWD-Mäusen eine erhöhte Auswurfate sowie einen erhöhten Th/r-Quotienten. Der Th/r-Quotient dient als Indikator für die Hypertrophie. In physiologisch normalen Herzen liegt dieser Quotient bei 0,33. Ist der Wert erhöht, liegt eine kompensatorische Hypertrophie vor [43, 132]. Im Gegensatz zu den B6-Tieren scheinen die PWD-Tiere ein größeres Herz zu haben, obwohl ihr Körpergewicht sowie ihr *Body mass index* (BMI; Verhältnis Körpergewicht zu Körperlänge im Quadrat) in beiden Geschlechtern weit unter B6 lagen. So zeigen männliche B6-Tiere ein KG von $30,7 \pm 1,98\text{g}$, die männlichen PWD-Tiere nur $17,9 \pm 1,06\text{g}$. Auch der BMI zeigt diese Unterschiede: männliche B6 haben

ein BMI von $3,95 \pm 0,249$ und männliche PWD-Tiere zeigen einen BMI von $2,55 \pm 0,096$ (www.phenome.jax.org). Bei den weiblichen Tieren verhält es sich genauso.

Aufgrundessen, dass PWD- und B6-Mäuse sich als Subspezien *Mus musculus musculus* und *Mus musculus domesticus* voneinander unterscheiden, repräsentieren sie eine große Anzahl an genetischen Unterschieden. Über 100.000 SNPs konnten bisher detektiert werden, von denen eine Menge die phänotypischen Merkmalen beeinflussen können, welche zum Teil anhand von QTL-Analysen identifiziert werden konnten [114]. In einigen Publikationen sind bereits Daten diverser Phänotypen für unterschiedliche Zuchtstämme veröffentlicht, bisher aber nur bedingt für PWD/Ph (Blutbild, wie Blutzusammensetzung, Blutchemie, usw. [114]). Deschepper et al. charakterisierten 13 unterschiedliche Maus-Stämme hinsichtlich ihres Blutdruck und morphologischen Merkmalen in kardiovaskulären Organen. Sie zeigten sowohl in männlichen als auch in weiblichen PWK/Ph im Vergleich zu B6 einen erhöhten Blutdruck und resultierend daraus eine erhöhte linksventrikuläre Masse in Relation zum Körpergewicht [137]. Das Gewicht des linken Ventrikels ist eine der wichtigsten unabhängigen Einflussgrößen, um kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität zu bestimmen. Umso höher die Masse des linken Ventrikels, umso höher die kardiovaskulären Risiken [138].

Die Untersuchung der F1-Generationen war hilfreich, um neue genetische Faktoren zu erforschen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die morphologischen Parameter, wie Wanddicke der Vorder- und Hinterwände als Zwischenstufe der beiden Stämme betrachtet werden können. Andere Parameter, wie Körpergewicht, intraventrikulärer Diameter, Auswurfrate und Th/r tendieren zur B6-Maus. Das zeigt, dass spezifische kardiale Entwicklungen genetisch beeinflusst werden. Die Forschung mit F1-Hybriden macht es demnach möglich, eine Anzahl genetischer Profile unterschiedlicher Stämme zu typisieren [139]. Auch in den Proteinmustern kann dieser genetische Einfluss auf die kardiovaskuläre Funktion und Entwicklung beobachtet werden.

Die phänotypischen Untersuchungen der CS14-Tiere zeigten ein deutlich vergrößertes Herz der männlichen CS14-Mäuse gegenüber den männlichen B6-Mäusen. Auch der Vergleich der weiblichen CS14-Tiere gegenüber den weiblichen B6-Mäusen zeigte das vergrößerte Herz des konsomischen Stammes, allerdings zu einem geringen Teil als in den männlichen Tieren. Bereits im Phänotyp konnten geschlechtsspezifische Merkmale innerhalb des CS14 festgestellt werden. Die männlichen CS14 zeigten ein signifikant vergrößertes Herz gegenüber den weiblichen CS14. Möglicherweise spielt hier das schwere Körpergewicht der männlichen CS14-Tiere eine Rolle. Dennoch war in den Ergebnissen ein signifikant vergrößertes Herz der CS14-Tiere gegenüber den B6-Tieren offensichtlich. Abbildung 39

zeigt eine Darstellung der geschlechtsspezifischen Unterschiede im Phänotyp am Beispiel von drei Merkmalen. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Herzrate zwischen männlichen und weiblichen Tieren keine Unterschiede zeigen. Das Körpergewicht und der Druckgradient in der Aorta sind aber offensichtlich geschlechtsspezifisch reguliert. Interessant ist dabei die Beobachtung, dass das Ausmaß der Geschlechtsunterschiede gentechnisch beeinflusst ist: der Druckgradient der Aorta ist unterschiedlich zwischen männlichen und weiblichen Tieren, aber bei CS14, B6 und PWD mit unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 39).

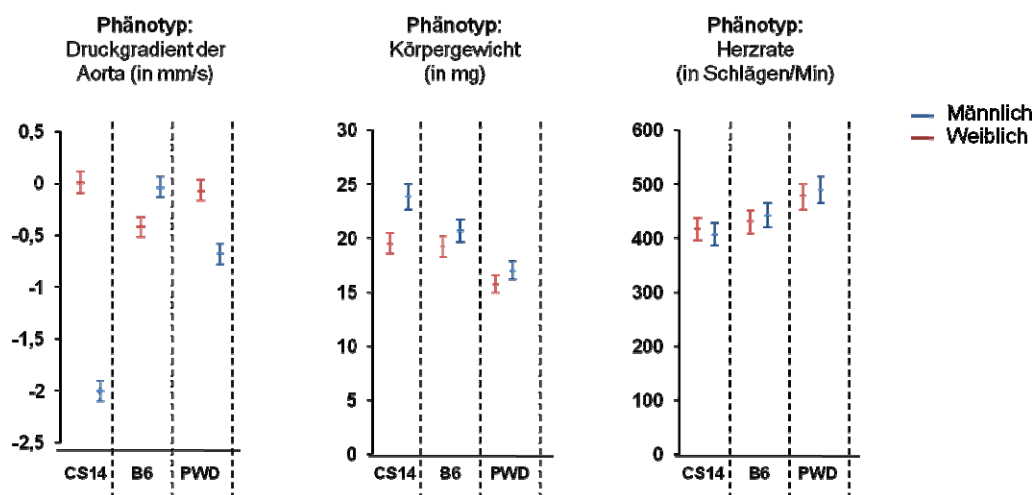


Abbildung 39: Darstellung der geschlechtsspezifischen Unterschiede im Phänotyp am Beispiel von drei Merkmalen. Geschlechtsspezifische Unterschiede sind im Körpergewicht und im Druckgradient der Aorta zu erkennen. Die Herzrate scheint keine geschlechtsspezifischen Merkmale zu zeigen.

Phänotypische Unterschiede, die die Morphologie und die Struktur der Herzen konsomischer Stämme betreffen, wurden bis dato noch nicht publiziert. Bisher wurden in einer umfangreicheren Studie Blutwerte bei verschiedenen männlichen und weiblichen CS untersucht (www.phenome.jax.org). Hierbei zeigte sich bei verschiedenen getesteten Parametern deutlich, dass das Ausmaß der Geschlechtsunterschiede von den betreffenden CS abhängig ist und somit unter genetischer Kontrolle steht. Abbildung 40 zeigt das Beispiel anhand der Blutglucosekonzentration innerhalb der unterschiedlichen CS. Hierbei ist deutlich zu sehen, dass die gemessene Glucosekonzentration sowohl in Geschlecht als auch in den einzelnen CS variiert.

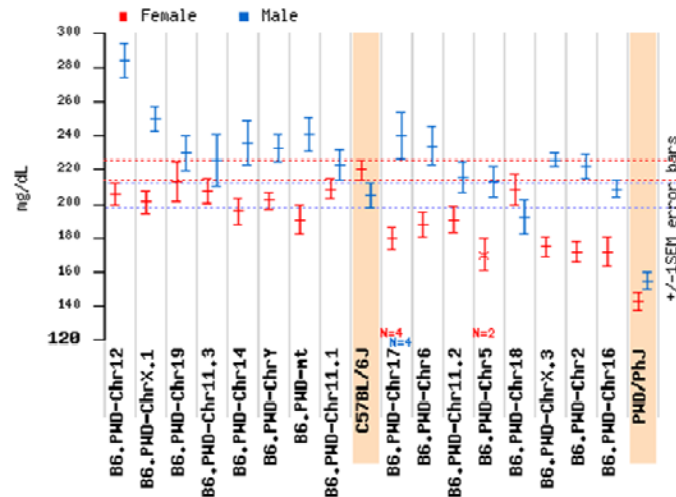


Abbildung 40: Darstellung der Blutglucosekonzentration in verschiedenen CS. Die gemessene Glucosekonzentration unterscheidet sich innerhalb der unterschiedlichen CS und innerhalb der Geschlechter. B6 und PWD sind farbig hervorgehoben (aus: www.phenome.jax.org).

4.2 Proteomanalyse von CS und parentalen Mäusestämmen bei Männchen und Weibchen

Im vorliegenden Projekt wurden die Gesamtextrakte der Herzen 11 Wochen alter männlicher und weiblicher Mauslinien (PWD, B6, F1, CS5, CS12, CS14, CS16, CS19) proteinbiochemisch aufgetrennt und analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass in den CS ganz unterschiedliche Anzahlen an Proteinvarianten auftraten, aber dennoch in den jeweiligen männlichen und weiblichen CS die Anzahl der varianten Proteinspots kaum variierten. So konnten in den CS12 sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Mäusen rund 25 variante Proteinspots detektiert werden, während in CS14 um die 75 variante Proteinspots analysiert werden konnten. Diese Unterschiede zeigen zum Einen, die hormonelle Unabhängigkeit der Anzahl an varianten Proteinen und zum anderen, die genetische Abhängigkeit der Proteinvariabilität. Insbesondere zwischen CS12 und CS14 wurde eine ähnlich hohe Anzahl an varianten Proteinen erwartet, da die Länge der konsomischen Chromosomen in etwa gleich ist. So besitzen Chr. 14 123 Mio. Basenpaare und Chr. 12 120 Mio. Basenpaare. Neben der simultanen Länge der konsomischen Chr korrelieren diese signifikant mit der Anzahl der Gene/Chr und der Anzahl der SNP/Chr, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Anzahl der SNP/Chr nicht ausschlaggebend für die hohe Anzahl an veränderten Proteinspots auf CS14 war, sondern eher der Transeffekt der primär-varianten Proteine (cis-Varianten) auf die exprimierten B6-Proteine. Dieser Transeffekt erfasst aber bei männlichen und weiblichen Tieren ähnlich viele Proteine, d.h. die geschlechtsspezifischen Faktoren (Hormone) bewirken hier keinen Unterschied. Während sich die männlichen und weiblichen Mäuse in ihrer Anzahl

Polymorphismus-varianter Proteine (männlich CS vs. männlich B6 und weiblich CS vs. weiblich B6) ähnlich verhalten, treten in den Expressionsleveln der Proteine deutlich Geschlechtsunterschiede auf: in weiblichen Mäusen waren mehr Runterregulierungen der Proteinexpressionen beobachtet worden, während in männlichen Mäusen die Proteine mehr überexprimiert vorlagen (Ausnahme stellte CS19 dar). Diese Ergebnisse konnten auch in verschiedenen Steroidogenese-Modellen sowohl an Zellen (H295R-Zellen) als auch an Organgeweben (Ovarien, Gehirn, Hypophyse) an Fischen (*Pimephales promelas*) beobachtet werden. War Östrogen im Organismus vorhanden, regulierte sich die Gen- bzw. Proteinexpression nach unten [140, 141]. In der vorliegenden Arbeit war ebenfalls auffällig, dass die identifizierten Proteine sich in den Geschlechtern unterschieden. Trotz identischer SNPs der konsomischen Chromosomen in den Geschlechtern konnten Unterschiede der identifizierten Proteine männlicher und weiblicher Mäuse detektiert werden. Keine 5% der identifizierten Proteine stimmten sowohl in männlichen als auch in weiblichen CS miteinander überein. Hier könnte sich zeigen, dass die geschlechtsspezifischen Hormone das Proteom unterschiedlich beeinflussen. Frauen unterliegen ständigen hormonellen Schwankungen, um den Körper auf mögliche Schwangerschaften vorzubereiten. Auch während und nach der Schwangerschaft muss sich der weibliche Körper metabolischer und hormoneller Veränderungen anpassen. Damit die Stoffwechselprozesse währenddessen nicht komplett aus dem Gleichgewicht gelangen, bildet der weibliche Organismus eine Art Puffersystem aus, um mögliche Störfaktoren zu minimieren oder auszugleichen. Als ein möglicher Puffer stellt wie oben bereits erwähnt das Östrogen dar, aber auch so genannte „Balancer“-Proteine können hierbei eine Rolle spielen [142]. „Balancer“-Proteine sind keine krankheitsrelevanten Proteine. Sie stellen bei genetischen Störungen oder Störungen durch äußere Einflüsse das Gleichgewicht im Proteom wieder her. Das kann bei Frauen anders balanciert sein als bei Männern.

Die geschilderten Ergebnisse spiegeln sich in den geschlechtsbezogenen Vergleichen wieder.

Eine Dominanz der geschlechtsspezifischen Faktoren zeigte sich im Vergleich PWD gegen B6. Zeigten männliche PWD-Mäuse gegen männliche B6-Mäuse 67 signifikant veränderte Proteinspots, so waren im Vergleich der weiblichen PWD- und B6-Tiere nur etwa die Hälfte variant (38 Proteinspots). Auch in den geschlechtsspezifischen Varianten (männlich vs. weiblich) zeigten die PWD-Tiere nur etwa die Hälfte aller signifikant veränderten Proteinspots im Gegensatz zu B6. Diese Betrachtung lässt bei reinen homozygoten Mausstämmen, wie die PWD-Maus, erkennen, dass das Proteom bei Männchen und Weibchen eine unterschiedliche globale Regulation zeigt: das männliche Proteom hat eine

stärkere Pufferkapazität als das weibliche Proteom und lässt offenbar eine höhere Variabilität der Proteine zu.

4.3 Veränderte Proteinfunktionen der CS und der parentalen Stämme bei Männchen und Weibchen

Veränderungen in der Proteinexpression zwischen CS und B6 sowie PWD und B6 wurden bis heute in der Literatur noch nicht beschrieben. Anhand der Vielzahl an SNPs, die innerhalb PWD und B6 identifiziert wurden und anhand der in dieser Arbeit detektierten phänotypischen Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen, kann davon ausgegangen werden, dass die größeren PWD-Herzen sowohl auf metabolischer als auch auf morphologischer Ebene zu veränderten Proteinexpressionen führen. Über 100.000 SNPs sind bis heute zwischen den beiden Inzuchtstämmen nachgewiesen worden. Nicht alle SNPs zeigen auch Wirkung auf der Gen- bzw. der Proteomebene. Bei Betrachtung der SNPs, die den codierenden Bereich der Gene betreffen und nicht synonym sind, konnte anhand des DAVID „Analysis Tools“ festgestellt werden, dass SNPs in Genen, die das alternative Spleißen betreffen dominieren. Genetische Modifikationen des Alternativen Spleißens können zu Fehlregulierungen der Gene und folglich zu Expressions- und Funktions-Veränderungen der Proteine, durch fehlerhafte Proteinfaltung, führen [143]. In einer kleineren Anzahl (<10%) zeigten die SNP-enthaltenden Gene Einschränkungen der ATPase Aktivität und der ATP-Bindung.

4.3.1 Proteinveränderungen im Energiestoffwechsel

Für die Herzfunktion spielt der Energiemetabolismus eine enorme Rolle. Das Herz benötigt für die Kontraktion rund 60-90% der gewonnenen Energie, die in Form von ATP vorliegt. Den größten Anteil an Energie in gesunden adulten Herzen liefert die β -Oxidation, gefolgt von der Glykolyse [77-79]. In den Proteom-Vergleichen PWD vs. B6 war auffällig, dass hauptsächlich mitochondriale Proteine mit Schwerpunkt Energiemetabolismus, wie Zitronensäurezyklus, oxidative Phosphorylierung oder andere energiegewinnende Metabolismen unterschiedlich exprimiert waren. Unterschiede im kardialen Energiestoffwechsel sind wichtige Faktoren u.a. in der Entwicklung von hypertrophierten Herzen, worin Ursachen wie Hypertonie und volumeninduzierte Herzinsuffizienz assoziieren [144]. Sowohl für den Elektronentransfer als auch für die ATP-Gewinnung ist vorallem die Atmungskette verantwortlich, welche aus fünf unterschiedlichen Komplexen besteht, die innerhalb der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind [145-147]. Bei genauerer Betrachtung der veränderten Proteine innerhalb der PWD vs. B6 zeigte der Vergleich

männlicher und weiblicher Tiere innerhalb des Komplexes I und in männlichen Tieren zu geringeren Teilen des Komplexes V geringere Expressionslevel. Durch die Veränderung der oxidativen Phosphorylierung innerhalb der Komplexe I und V scheint die Energieproduktion und die Utilisation beeinträchtigt zu sein. In der vorliegenden Literatur wurde gezeigt, dass Mausmutanten, die eine Hypertrophie ausbilden ebenfalls diese Komplexe beeinträchtigt waren [147, 148]. Werden die Resultate der veränderten mitochondrialen Proteine zusammengefasst, war ein eingeschränkter Energiemetabolismus, der oxidativen Phosphorylierung in den PWD-Mäusen beobachtet worden. Die Vermutung liegt nahe, dass die PWD-Tiere durch ihr vergrößertes Herz nicht soviel Energie aufwenden müssen als B6-Tiere mit einem kleineren Herz. Dies zeigten auch die phänotypischen Merkmale. So haben PWD-Tiere im Vergleich zu B6-Tieren eine signifikant erhöhte Ejektionsfraktion, was bedeutet, dass die PWD-Mäuse pro Herzschlag mehr Blut in den Körperkreislauf pumpen können als die B6-Mäuse. Insgesamt benötigen sie also weniger energetische Aufwendung, um den Körper mit Nährstoffen zu versorgen, als B6-Tiere.

Die F1-Tiere zeigten zwar im Vergleich zu B6 keine Proteinveränderungen innerhalb der Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung, allerdings zeigten sie Veränderungen im Vergleich zu den PWD-Tieren. Sowohl in männlichen als auch in weiblichen PWD-Tieren war Komplex I der Atmungskette runterreguliert. Diese unterschiedlichen Proteinexpressionen zeigten, dass die F1-Mäuse in ihrer Morphologie und Physiologie des Herzens zu B6-Mäusen tendieren. Wie ihre Kontrollen zeigten auch F1-Mäuse keine Anzeichen einer kardialen Hypertrophie.

Auch im Vergleich der einzelnen CS mit den B6-Tieren konnte festgestellt werden, dass in allen sowohl männlichen als auch weiblichen CS die mitochondrialen Proteine und resultierend daraus der Energiestoffwechsel beeinträchtigt war. Besonders beteiligt waren die Isoformen der NADH Dehydrogenasen und deren Komplexe der oxidativen Phosphorylierung. Das Einschleusen der konsomischen Chromosomen und somit der SNPs beeinträchtigen demnach die Energieproduktion und die Utilisation. Die konsomischen Chromosomen besitzen unterschiedliche SNPs, die durch den Chromosomenaustausch in die Akzeptor-Tiere überführt werden. SNPs assoziieren u.a. mit differenten Phänotypen, die dadurch auch vermehrt zu diagnostischen Zwecken verwendet werden können [149]. Bei der SNP-Detektion anhand der Datenbank „DAVID Analysis Tool“, konnte festgestellt werden, dass jede der Enzyme der Komplexe ein oder mehrere SNPs auf den Chromosomen besaßen. Interessanterweise waren aber nur selten die konsomischen Chromosomen betroffen. So genannten „Netzwerkeffekte“ bilden sich hierbei aus. Hierbei genügt ein „Modifier“ auf dem konsomischen Chromosom, der das Gleichgewicht des gesamten Netzwerks außer Kontrolle bringen kann.

4.3.2 Proteinveränderungen im kontraktilen Apparat

Der kontraktile Apparat des Herzens bildet einen essentiellen Bestandteil der motorischen kardialen Funktion. Biochemische Veränderungen können hierbei eine wichtige Rolle in der Funktionalität spielen. Bei der Kreuzung zweier Mausstämme, können vererbte Punktmutationen entscheidend sein. 7,6% aller SNPs der kodierenden nicht synonymen Bereiche, betreffen das Zytoskelett und resultierend daraus auch Gene des kontraktilen Apparates. Umso erstaunlicher ist es, dass in den Vergleichen zwischen PWD und B6 keine nennenswerten Proteinveränderungen, die den kontraktilen Apparat betreffen, nachgewiesen wurden. Die Beeinträchtigung der Gene durch die SNPs ist demnach so gering, dass die Proteinexpression und –funktion dadurch nicht beeinflusst wurden und die motorische Funktionalität des Herzens weiterhin unverändert bestand. Die Stabilität der Proteine des kontraktilen Apparates ist für die Lebensdauer eines Individuums von enormer Wichtigkeit. Die in den Phänotypen auftretenden Unterschiede lassen sich hierbei nicht über die kontraktilen Proteine erklären, sondern u.a. über den veränderten Energiestoffwechsel der PWD-Tiere im Vergleich zu den B6.

Beim Vergleich der F1-Generationen mit den parentalen Stämmen PWD und B6, konnten Veränderungen hinsichtlich der kontraktilen Proteine quantitativ analysiert werden. Hierbei werden die hereditären Auswirkungen der SNPs innerhalb der betreffenden Gene in den Proteinmustern deutlich. In Bezug auf myokardiale Hypertrophie sind bis dato keine Daten publiziert. Vereinzelt waren sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Tieren die gleichen Isospots aus der Myh6-Gruppe in der F1-Generation weniger exprimiert als in den PWD-Mäusen. Das Myh6 dient zur Regulation des Blutdrucks, der ATPase-Aktivität, der Herzentwicklung und der Regulation der Kontraktionsstärke im Herzen. So haben Tiere mit einer höheren Herzrate, einer schnelleren Herzmuskelkontraktion und resultierend daraus einer erhöhten ATPase-Aktivität einen erhöhten Myh6-Level als Tiere, deren Herz langsamer schlägt [150, 151]. In pathologisch veränderten Herzen, wie z.B. bei Hypertrophie nimmt die Myh6-Expression ab, wogegen die Myh7-Konzentrationen zunimmt [152, 153]. Das Verhältnis dieser beiden Myosin-Formen spielt eine entscheidende Rolle in der Pathologie des Herzens. Liegt im physiologisch normalen Herzen das Myh6:Myh7-Ratio zwischen 3 und 4, zeigen hypertrophierte Herzen oft ein geringeres Ratio (<2) [154]. Diese Proteinverschiebungen sind assoziiert mit einer Reduktion der Geschwindigkeit der Kontraktion sowie Veränderungen innerhalb der systolischen Funktionen [153]. Das Phänomen dieser Proteinverschiebungen konnte bisher nur auf mRNA-Ebene, nicht auf Proteinebene analysiert werden. Bis heute sind keine Publikationen veröffentlicht worden, die anhand von 2D-Elektrophorese das Myh7 detektieren konnten. Myh6 und Myh7 besitzen ähnliche Molekulargewichte und pI-Werte. So liegt Myh6 in einem molekularen Bereich von

223 kDa sowie bei einem pI von 5,57 und Myh7 bei einem Molekulargewicht von 222 kDa und einem pI von 5,59. Bei genauerer Betrachtung der MS-Daten war zu erkennen, dass bei 34% aller Myh6-Spots Myh7 ebenfalls identifiziert, aber durch Setzen der Filter trotz hoher Scores eliminiert wurde. Die Sequenzabdeckung war nahezu identisch (99,95%), so dass das Programm Mascot Myh7 womöglich aufgrund geringerer Proteinkonzentrationen in den Hintergrund setzte. Durch 2D-Elektrophorese und folgender MS scheint es schwierig zu sein, Myh7 nachzuweisen und zu identifizieren. mRNA-Untersuchungen zeigen dieses Problem nicht. Hier können Myh7 und Myh6 unkompliziert analysiert werden.

Rückblickend auf die SNPs zwischen PWD und B6 war zu erkennen, dass die Gene von Myh6 und Myh7 von Punktmutationen betroffen waren, allerdings nicht wie zu erwarten war in den codierenden Bereichen, sondern in den regulatorischen Bereiche der Gene. F1-Generationen enthalten einen heterozygoten Chromosomensatz und beziehen somit die Chromosomen der PWDs und B6 in gleichen Maßen. Resultierend daraus zeigen dementsprechend F1-Tiere gegenüber den parental Stämmen Proteinveränderungen, wohingegen in der Gegenüberstellung der parental Stämme, diese Proteinveränderungen nicht detektiert wurden.

Innerhalb der Vergleiche CS vs. B6 zeigten sich bedeutende Unterschiede im kontraktilem Apparat sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen CS14-Tieren. Für die Herzentwicklung und für die Herzfunktion scheint Chr. 14 eine wichtige Rolle zu spielen. Bereits 2003 konnte das humane Chr. 14 komplett entschlüsselt werden. Heilig und Kollegen stellten fest, dass auf dem humanen Chr. 14 über 60 Krankheitsgene lokalisiert sind, darunter die Gene, die bei der Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie eine Rolle spielen (Myh6 und Myh7) [155]. Myh6 und Myh7 sind nicht nur in *Homo sapiens* auf Chr. 14 lokalisiert, sondern auch in *Mus musculus* [151]. Interessanterweise zeigten männliche CS14-Tiere eine zu 44% reduzierte Expression aller Myh6-Proteinspots, weibliche CS14-Tiere eine Runterregulierung von 34%. Myh7 konnte aus technischen Gründen noch nicht quantifiziert werden. Hypertrophierte Herzen zeigen eine auf 10% bis unter 1% reduzierte mRNA-Expression der Myh6-Level, dagegen aber eine ansteigende Expression der Myh7-Level [150, 156]. Interessanterweise besitzen Myh6 und Myh7 SNPs in den Introns der Gene, die normalerweise keinen Einfluss auf das Genom bzw. Proteom ausüben. Dennoch zeigen die CS14-Mäuse im mRNA-Level eine signifikant erhöhte Expression der Myh7 und eine reduzierte Expression der Myh6 auf Proteinebene. Es scheint also, dass SNPs in den Introns in der Expression von Genen und Proteinen doch eine Rolle spielen. Anhand des erhöhten Myh7-Niveaus auf mRNA-Ebene und des erniedrigten Myh6-Niveaus auf Protein-Ebene scheinen CS14-Mäuse zur Hypertrophie zu neigen. Wie sich diese

veränderten Parameter der CS14 in einer myokardialen Hypertrophie auswirken, zeigt sich im Krankheitsmodell (Kapitel 4.6).

4.4 Geschlechtsspezifische Expression und Funktion von varianten Proteinen aus CS-Mausstämmen

Beim Vergleich der varianten Proteinspots innerhalb der männlichen und weiblichen CS-Tiere konnte festgestellt werden, dass nur eine geringe Anzahl (5 Proteinspots) an signifikant veränderten Proteinen in männlichen und in weiblichen CS-Mäusen identisch waren und bei verschiedenen CS auftraten. Diese 5 identisch veränderten Proteinspots können alle dem Protein α -1-Antitrypsin und seinen Isoformen zugeordnet werden, ein in der Literatur bekanntes geschlechtsspezifisches Protein, welches über Testosteron kontrolliert wird [157]. Dieses Protein zeigt, dass die Veränderungen auf hormoneller Ebene stattfinden. Durch die unterschiedlichen Expressionslevel innerhalb der einzelnen CS, zeigte sich jedoch, dass nicht nur die Hormone eine Rolle in den Proteinveränderungen, sondern auch die Gene. Je nach konsomischen Chromosom war der Stärkegrad der Proteinexpression bei Männchen und Weibchen unterschiedlich reguliert (Abbildung 41). Tpm1 war ein weiteres Beispiel dafür, dass die Expression bestimmter Proteine bei Männchen und Weibchen genetisch unterschiedlich reguliert werden (Abbildung 41).

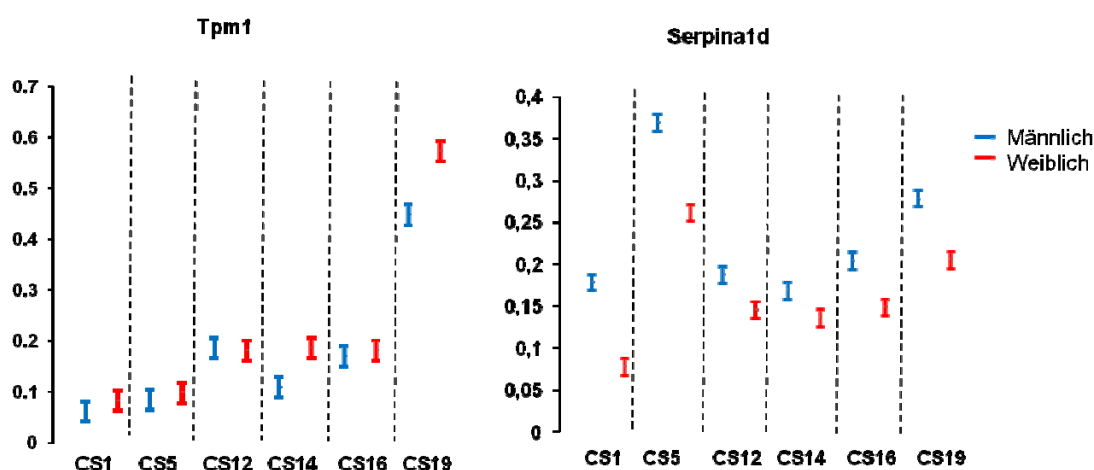


Abbildung 41: Exemplarische Darstellung der unterschiedlichen Expressionen von Proteinen bei Männchen und Weibchen. Die Isoform des Tropomyosins (Tpm1) zeigt geschlechtsspezifische Expression bei CS14 und CS19. Die Isoform des α -1-Antitrypsin (Serpina1d) zeigt solche Unterschiede in jedem CS.

Bei Betrachtung der funktionellen Klassen innerhalb der geschlechtsspezifischen Proteinexpressionen war auffällig, dass sowohl in den PWD-Tieren als auch in der F1-Generation und der CS (Ausnahme CS12) der Komplex I der oxidativen Phosphorylierung in weiblichen Tieren in mehreren Enzymen hochreguliert war. Eine mögliche Ursache könnte

das Östrogen darstellen. Es ist bekannt, dass prämenopausale Frauen ein geringeres Risiko besitzen an kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken als Männer [158, 159]. Durch das Binden des Östrogens an die Östrogenrezeptoren innerhalb des Nuklei und der Mitochondrien werden Replikations-, Transkriptions- und Translationsfaktoren stimuliert und aktiviert. Über eine Translokase gelangen die Faktoren aus dem Kern in die Mitochondrien, wo sie mit den mitochondrialen Faktoren die Komplexe der Atmungskette beeinflussen. Die Konsequenz aus beiden Prozessen ist eine Hochregulierung der respiratorischen Proteinexpression, wodurch eine vermehrte Energieproduktion in Form von ATP erfolgt [160]. Resultierend daraus scheint der metabolische Adaptationsprozess der weiblichen Tiere bei kardiovaskulärer Erkrankung einen anderen Verlauf zu haben als bei männlichen Tieren.

Die kontraktile Proteine zeigten in den männlichen parental Tieren und der F1-Generation eine reduzierte Expression. Auffällig war, dass mit Ausnahme von Myl4 und Myl7, keine weiteren geschlechtsspezifischen Proteine vertreten waren, da in CS keine geschlechtsspezifischen Proteinveränderungen innerhalb des kontraktile Apparates detektiert wurden (Ausnahme CS19). Die Proteine des kontraktile Apparates unterliegen demnach keinen hormonellen Schwankungen. In mindestens zwei Stämmen waren Myl4 und Myl7 sowohl in männlichen B6 als auch in männlichen PWD im Vergleich zu den weiblichen Mäusen herunterreguliert. Diese beiden Myl-Formen werden vorwiegend in fetalen Herzen exprimiert und dienen der Herzentwicklung. Nach der Geburt sinkt dieses Expressions-Level wieder ab [161]. Ein Wiedererscheinen der Myl-Isoformen in adulten Herzen ist oftmals ein Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie z.B. Myokardhypertrophie [162]. Anhand von Mausexperimenten konnte die Arbeitsgruppe um Scheuer bereits 1987 eine Testosteron- bzw. Östrogen-Abhängigkeit der Myosin-ATPase-Aktivität feststellen, wobei das Myosin durch die Östrogenbehandlung eine höhere Aktivität zeigte als durch die Testosteron-Applikation [163].

4.5 Vergleichende Untersuchungen zur Variabilität der Proteine und mRNA bei CS

Die varianten Proteine wurden auf die Chromosomen kartiert. Es zeigte sich, dass die signifikant veränderten Proteine weitestgehend trans-Effekte ausübten. Die Gene der in ihrer Expression veränderten Proteine waren demnach nur in wenigen Fällen auf dem konsomischen Chromosom lokalisiert. Trotz dieses Befundes konnte bei der Überprüfung der Korrelation zwischen der Anzahl der SNP/Gen und der Anzahl der varianten Proteine eine signifikante Abhängigkeit festgestellt werden (Ausnahme CS14) ($R^2=0,607$). Ganz anders verhielt es sich bei den Beobachtungen der mRNAs: variante mRNAs zeigten einen

hohen Anteil an cis-Varianten, welche gut mit der Anzahl an SNP/Gen korrelierten ($R^2=0,629$). Trans-Varianten weichten hingegen stark ab ($R^2=0,046$).

Auf mRNA-Ebene scheinen demnach Netzwerkeffekte eine andere Rolle zu spielen als auf Proteomebene. Ein Beispiel: Zellen exprimieren in unterschiedlichen Geweben tausende von Genen. Einige Gene werden durch multiple Transkriptionsfaktoren reguliert, welche eine Menge an Genen kontrolliert. Diese interaktiven Gene bilden ein regulatorisches Netzwerk, welches die Expression verschiedener Gene bestimmt. Co-regulierte Gene bilden eine spezifische Zell-Struktur bzw. beeinflussen diverse Zellfunktionen. Regulatorische Netzwerke laufen mehrstufig innerhalb der Sub-Netzwerke ab. Protein-Proteininteraktionen hängen dagegen auch von rein biochemischen Reaktionen (z.B. Enzymen) ab und entwickeln damit andere Netzwerke. Dies erklärt unter anderem, warum die mRNA-Daten auf Proteindaten nicht übertragbar sind. Auf Proteinebene können völlig andere Proteine verändert sein, als mRNAs auf Genebene.

Die hohe Zahl an trans-Proteinvarianten bei einigen CS, wie CS14, könnte auf den enthaltenen SNPs des konsomischen Chromosoms beruhen. Bei der Analyse der kodierenden nicht-synonymen SNPs, ist zu erkennen, dass die SNPs enthaltenden Gene auf Chr. 14 hauptsächlich die Chr-Organisation betreffen und überwiegend die Telomer-Organisation, so dass die Zellseneszenz und der „Schutz“ der Chromosomen beeinträchtigt zu sein scheinen. Fällt die Stabilität der Chromosomen zusammen und setzt die Alterung ein, kann es Folgen für die Translation und Transkription diverser Proteine haben, die nicht nur auf Chromosom 14 lokalisiert sind. Genetische Informationen können nicht mehr weiter gegeben werden und über Netzwerkeffekte treten mRNA- bzw. Proteinveränderungen ein. Nicht nur SNPs, die die codierenden Sequenzen enthalten sondern auch die regulatorischen Einheiten beeinflussen, können sich auf die Expression der mRNAs und Proteine auswirken. Der hohe Transeffekt bei CS14 im Gegensatz zu CS12 könnte sich dadurch erklären, dass das Proteom von CS14 einer anderen globalen Regulierung unterliegt als das Proteom von CS12.

4.6 Einfluss von Geschlecht und genetischer Variabilität im Proteom auf den Schweregrad von Herzhypertrophie

In der Untersuchung von CS14 soll gezeigt werden, inwieweit die genetische Variabilität und die geschlechtsspezifische Physiologie (hormonelle) Auswirkungen auf die Entwicklung von Herzhypertrophie haben. Hierzu wurden in männlichen und weiblichen CS14-Tieren sowie in B6-Tieren Myokardhypertrophie induziert.

Die konzentrische Hypertrophie entwickelt sich bei anhaltender Drucklast zur maladaptive Hypertrophie, die häufig in einer Herzinsuffizienz endet. Störungen der diastolischen und systolischen Funktion, verbunden mit der Dilatation des linken Ventrikels sind hierbei von großer Bedeutung [164]. Die phänotypischen Parameter der Tiere dieses Projektes zeigten, dass die Tiere neun Wochen nach TAC ein hypertrophiertes Herz aufwiesen. So war die EF sowohl in B6 als auch in CS14 TAC-Tieren signifikant niedriger als in Sham-operierten Mäusen und der Dilatationskoeffizient signifikant erhöht, ebenso LVM/TL. Dies war allerdings nicht bei männliche CS14 beobachtet worden.

Anhand der reduzierten Myh6-Expression der CS14-Tiere, war davon auszugehen, dass die Auswirkungen der Aortenstenose auf den untersuchten konsomischen Stamm einen negativeren Einfluss ausüben als auf die Kontrolltiere B6. Jedoch konnte echokardiographisch gezeigt werden, dass CS14 in Bezug auf die phänotypischen Merkmale eine weniger ausgeprägte Hypertrophie nach einer 9 wöchigen Behandlung zeigten, als B6. Die EF war höher und die LVM/TL geringer in männlichen CS14. Trotz vermeindlich schlechteren Vorraussetzung der CS14 durch die reduzierten Myh6-Expression, bewältigten diese die Aortenstenose besser als die Kontrolltiere. Eine mögliche Erklärung wäre folgende: ein vermindert exprimiertes Myh6 und ein erhöht exprimiert Myh7 im mRNA-Level sind normalerweise typische Marker für eine Hypertrophie. In den gesunden CS14-Tieren zeigten sich diese Veränderungen nur zum Teil. Myh7 ist im mRNA-Level erhöht exprimiert, Myh6-Level im Proteinmuster bei CS14 vermindert reguliert. Normalerweise würden die Tiere mit verminderten Myh6-Leveln eine verminderte Kontraktion des Herzens zeigen, was aber sowohl im gesunden als auch im kranken Stadium der männlichen CS14-Mäuse ausgeschlossen werden konnte. Allerdings wurde die Herzrate nur mittels Echokardiographie bestimmt, wo Umweltfaktoren, wie z.B. die Dosierung der Narkosemittel, die Herzrate negativ beeinflussen konnten. Um diesen Punkt 100%ig ausschließen zu können, hätten weitere Untersuchungen, wie Blutdruckmessungen folgen müssen. Eine um durchschnittlich 44% Reduzierung der Myh6-Expression zeigt dementsprechend keinen Einfluss auf die Kontraktionsgeschwindigkeit, hat aber positive Auswirkungen in Bezug auf EF und LVM/TL. Dieses Phänomen ist hauptsächlich in den männlichen CS14-Tieren zu sehen. In gesunden weiblichen CS14-Tieren war das Myh6 zwar geringer exprimiert als in den Kontrolltieren, um durchschnittlich 34%, aber während der Drucklast zeigten diese eine nochmalige verminderte Expression um durchschnittliche 10%. Interessanterweise zeigte das Myh6-Proteinmuster in den männlichen CS14 keine weiteren Veränderungen nach der 9-wöchigen Behandlung nach der TAC-Operation. Es scheint, dass das Myh6 im Proteinmuster nur bis zu einem gewissen Prozentsatz geringer exprimiert werden kann. Liegt diese „Schwelle“ schon vor Beginn der Krankheit vor, ist das

Herz von Natur aus besser adaptiert als Herzen mit einer höheren Myh6-Konzentration. Sowohl die genetische als auch die hormonelle Variabilität spielt hier eine Rolle. Die männlichen CS14-Mäuse kompensieren in diesem Fall die Myokardhypertrophie besser als die weiblichen CS14-Tiere. Versucht der weibliche Organismus die verminderte Myh6-Expression zu kompensieren, versucht der männliche Organismus der CS14 sich an die gegebenen Umstände anzupassen. Dies bedeutet allerdings nicht, dass sie einer Drucklast auf Dauer Stand halten können, aber sie reagieren dennoch stabiler auf eine solche Einwirkung, durch eine bessere EF.

In den unterschiedlichen Hypertrophieformen existieren unterschiedliche Proteinexpressionen. So steigt die Synthese der kontraktilen Proteine in der frühen Entwicklungs-Phase der konzentrischen Hypertrophie an, während eine reduzierte Proteinsynthese in der späten Entwicklungsphase der exzentrischen Hypertrophie auftritt [165-168]. Die einfaktorielle ANOVA zeigte in eigenen Ergebnissen neun Wochen nach TAC 160 variante Proteinspots im Vergleich männlich versus weiblich, 190 signifikant veränderte Proteinspots bei CS14 vs. B6 und 18 variante Proteinspots im Vergleich TAC vs. Sham. Hauptsächlich waren in diesen drei Vergleichen unterschiedliche Proteinexpressionen innerhalb der mitochondrialen Proteine und der Proteine des kontraktilen Apparates analysiert worden. Adulte Herzen besitzen einen extrem hohen Energieverbrauch (60-80%) der kardialen ATP-Produktion durch aerobe und anaerobe Glykolyse sowie β -Oxidation [169, 170]. Die Hauptenergiequelle in gesunde Herzen stellt die β -Oxidation dar. In hypertrophierten Herzen verlagert sich der essentielle Energielieferant jedoch in Richtung Glykolyse [171]. In den TAC-Tieren dieses Projektes konnte festgestellt werden, dass die Enzyme, die den letzten Schritt der β -Oxidation katalysieren, vermindert exprimiert vorlagen. Als Folge wird das Endprodukt der β -Oxidation, Acetyl-CoA vermindert produziert. Acetyl-CoA ist ein essentielles Endprodukt, welches das entsprechende Glykolyse: β -Oxidation-Verhältnis reguliert. Durch das Einschleusen in den Zitrat-Zyklus kann die Energieproduktion starten. Wird Acetyl-CoA durch die β -Oxidation geringer bereitgestellt, beginnt die Glykolyse mit dem Ausgleich dieses Defizits, indem vermehrt Glucose zu Acetyl-CoA verstoffwechselt wird [171]. Diese verstärkte Energieproduktion über die Glykolyse konnte in der Überexpression der Proteine der TAC-Tiere dieses Projektes ebenfalls festgestellt werden. Zamorano-León et al. konnten an spontan hypertensiven Ratten (SHR) eine Überexpression der Pyruvat-Dehydrogenase feststellen, was ebenfalls zu einer vermehrten Acetyl-CoA-Verstoffwechslung in hypertrophierten Herzen führte [172]. Desweiteren war in den hypertrophierten Herzen der Tiere dieses Projektes der Zitrat-Zyklus negativ beeinträchtigt, indem Enzyme dieses Zyklus vermindert exprimiert vorlagen. Die über den Abbau von Succinat zu Fumarat gewonnenen Elektronen werden über die oxidative Phosphorylierung

zu Energie in Form von ATP verstoffwechselt [173]. Liegt dieser Schritt in verminderter Form vor, ist die Energieausbeute weniger als 100%.

In der multifaktoriellen ANOVA konnten signifikant veränderte Proteine analysiert werden, die von unterschiedlichen Faktoren, wie Genetik, Geschlecht und Hypertrophie beeinflusst wurden. Die Proteinklassen, die innerhalb der Vergleiche der voneinander abhängigen Faktoren Genetik und Hypertrophie (15 signifikant veränderte Proteinspots) in ihrer Regulierung beeinflusst wurden, waren hauptsächlich der Energiemetabolismus, die mitochondrialen Proteine. Während der Hypertrophie-Entwicklung unterscheiden sich beide Stämme innerhalb der Komplexe II und IV der oxidativen Phosphorylierung voneinander. Beide Komplexe sind in den CS14-Tieren stärker exprimiert als in den B6-Tieren und scheinen somit eine protektive Wirkung gegenüber linksventrikulärer Myokardhypertrophie auszuüben.

In diversen *in vivo* Experimenten wurde bereits publiziert, dass weibliche Säuger im Gegensatz zu männlichen während einer Aortenstenose ein kleineres ventrikuläres Volumen und folglich eher eine konzentrische Form der myokardialen Hypertrophie ausbilden, während männliche Säuger eine ekzentrische Form entwickeln [43, 44]. Fliegner et al. untersuchten an männlichen und weiblichen C57BL/6-Tieren die Auswirkungen der Aortenstenose auf echokardiographische Parameter. Bis auf das Körpergewicht und die LVM/TL zeigten diese innerhalb beider Geschlechter keine signifikanten Unterschiede, dennoch konnte die differenten Entwicklungsformen der myokardialen Hypertrophie anhand der Kardiomyozytengröße und Komponenten der Extrazellulärmatrix, wie z.B. Fibrosierung nachgewiesen werden [174]. Tiere des vorliegenden Projektes zeigten ebenfalls 9 Wochen nach der Operation geschlechtsspezifische Unterschiede der Körpergewichte, allerdings keine signifikanten Unterschiede der LVM/TL. Auffallend war jedoch, dass männliche CS14 nach einer 9-wöchigen Aortenstenosen-Behandlung zu einer besseren EF-Rate tendierten als die weiblichen CS14, jedoch nicht signifikant. Anhand der multifaktoriellen ANOVA konnten mögliche Proteinkandidaten analysiert werden, die in männlichen CS14-Mäusen den operativen Eingriff mit Hypertrophie-Folgen besser zu kompensieren scheinen als die weiblichen CS14-Tiere sowie deren Kontrolltiere. Eine essentielle Rolle scheint im Vergleich der Stämme bei der Hypertrophieentwicklung unter dem geschlechtsspezifischen Aspekt die Proteine des kontraktiven Apparates zu spielen, wie Des, Myh6, Tnnt2 und Pdlm5. Diese Proteine zeigen Mutationen mit folgenden Dysregulationen in Patienten mit Kardiomyopathien [175]. Im Vergleich B6 und PWD traten in den veränderten Proteinen des kontraktiven Apparates SNPs auf. Auch wenn die durch SNP-beeinträchtigten Gene (mit Ausnahme Myh6) nicht auf Chr. 14 lokalisiert sind, scheinen diese einen Effekt auf die Protein-Expression in männlichen CS14 zu haben, welche sich positiv auf den kranken

Phänotypen auswirken. Die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels der männlichen CS14-Mäuse zeigt trotz Stenose tendentiell eine höhere Leistung als derer Kontrolltiere und der weiblichen CS14.

4.7 Limitation des Krankheitsmodelles

Die Induktion der linksventrikulären Hypertrophie durch eine transversale Aortenkonstriktion ist ein anerkanntes und reproduziertes Verfahren. Dennoch können Unterschiede während der Hypertrophieentwicklung und der folgenden Herzinsuffizienz auftreten, obwohl die Geschlechter und die Tierstämme identisch sind. Die Gründe dieser Differenzen unterliegen zum einen biologischer und individueller Schwankungen zum anderen operativer Schwankungen, wie Lockerung der Knoten oder Einwachsen des Fadens in der Aortenwand [176]. Für die Konstriktion muss die Aorta exponiert werden, wodurch das Entfernen von Bindegewebe erforderlich ist, so dass ebenfalls Variationen möglich sein können. Da in den durchgeführten Untersuchungen ein entsprechendes Signifikanzniveau erreicht war, kann davon ausgegangen werden, dass die Einflüsse minimal waren. Dennoch ist nicht von der Hand zu weisen, dass sowohl für männliche als auch für weibliche CS14-Tiere weitere Operationen anstehen, um die n-Zahl zu erhöhen. Um einen ersten Trend zu setzen reichte die Anzahl allerdings aus. Aufschlussreich werden die folgenden Experimente sein, die in gleicher Weise mit CS12 durchgeführt werden sollen, da sich die Variabilität der Proteine bei CS12 drastisch von CS14 unterscheiden.

Für die Untersuchung phänotypischer Merkmale wurde die Echokardiographie angewendet, die als etablierte Standardmethode anerkannt ist. Genauere Analysen der systolischen und diastolischen Herzfunktion könnten allerdings mit hämodynamischen Verfahren, wie mit der so genannten Konduktanzmessung erfolgen, wodurch genauere Aussagen über das Druck-Volumen-Verhältnis gemacht werden könnten, die einen Rückschluss auf die Herzfunktion zulassen würden.

Das Einsetzen der Zeitpunkte und der 26-Gauge-Nadel wurde aufgrund publizierter Daten gewählt [133, 177]. Eine stärkere Ausprägung des Krankheitsbildes wäre wahrscheinlich durch eine längere Konstriktionszeit sowie eine dünnere Nadel zu erreichen, was sich folglich in den Proteinmustern stärker zeigen ließe. Allerdings wäre die Überlebensrate der TAC-Tiere bedeutend geringer.

4.8 Ausblick

Um die erblichen Faktoren genauer bestimmen zu können sollen zukünftig auch PWD-Tiere mit der drucklastinduzierten Hypertrophie induziert werden. Vorversuche fanden diesbezüglich bereits statt, die einige Probleme der PWD-Tiere diesbezüglich offenlegten. Zum einen zeigten sie trotz mehrwöchiger Zufütterung ein zu geringes Körpergewicht zum anderen kollabierten diese Tiere während der Ketamin-Xylazin-Narkose innerhalb der ersten 5 Minuten. Eine geeignete Narkose-Technik mit Isofluran wird zurzeit im Labor etabliert. Desweiteren sollen als Gegenspieler zu den CS14-Mäusen auch CS12-Tier mit der drucklastinduzierten Hypertrophie behandelt werden, da diese die geringste Variabilität im Proteom-Muster aufwiesen. Als weiterer morphologischer Parameter sollen alle Herzen auf ihre Fibrosierung untersucht werden. Die Fibrosierung der Herzen spielt eine wichtige Rolle bei der Hypertrophieentwicklung, da die Kontakte der Kardiomyozyten durch eine Fibrosierung verändert werden können und diese u.a. Erregungsleitungen verhindern können. Wichtig wäre, diesen Prozess, zwischen den B6 und CS14 zu analysieren. Die Hypothese liegt nahe, dass die Fibrosierung in den CS14 anders verläuft als in den B6.

Um geschlechtsspezifische Aspekte genauer zu untersuchen, soll zukünftig eine Ovariectomie der weiblichen Tiere durchgeführt werden. Der Entzug des weiblichen Hormons Östrogen entspricht einem kleinen Eingriff, kann aber enorme Auswirkungen auf die Proteine ausüben. Dieses Verfahren ermöglicht eine globale Beobachtung aller hormongesteuerter Proteine während der drucklastinduzierten Hypertrophie.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war den Einfluss von geschlechtsspezifischen Faktoren auf die Ausprägung von Herzhypertrophie zu untersuchen. Dabei ging es besonders um die Frage, in wieweit die natürlich gegebenen Singel Nukleotid Polymorphismen (SNP), also genetische Faktoren, Einfluss auf den Grad der Geschlechtsspezifität nehmen; auf Proteomebene sowie auf Phänotyp-Ebene.

Für die Geschlechterentwicklung spielt das Y-Chromosom eine entscheidende Rolle. Auf ihm ist das *sex-determining region of Y* (SRY)-Gen lokalisiert, das durch die Regulierung entsprechender Gene für die Gonadenentwicklung verantwortlich ist. Die von den Gonaden erzeugten Hormone Testosteron und Östrogen sind maßgeblich für die Entstehung der Geschlechtsunterschiede und beeinflussen demnach auch die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen. Um die genetischen Einflüsse zu untersuchen, wurden Konsomische Stämme (CS) sowie deren parentalen Stämme auf Proteomebene und der Eben von Phänotypen analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit auch der genetische Hintergrund von unterschiedlichen Individuen, d.h. Polymorphismen, die Geschlechtsspezifität von Herzkrankheiten (hier myokardiale Hypertrophie) beeinflussen.

Es konnte gezeigt werden, dass die parentalen Stämme *M. m. domesticus* (C57BL/6 (B6)) und *M. m. musculus* (PWD/Ph (PWD)) in ihren kardialen Phänotypen bereits signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede aufwiesen. So konnte anhand echokardiographischer Untersuchungen im Vergleich der PWD gegenüber B6 sowohl in der Diastole als auch in der Systole eine vergrößerte Vorderwand (IVSd und IVSs), eine vergrößerte Hinterwand (LVPWd und LVPWs) sowie ein kleinerer linksventrikulärer Innendiameter (LVIDd und LVIDs) bestimmt werden. Nicht nur im Phänotyp zeigten sich diese Unterschiede sondern auch im Proteinmuster und in der mRNA-Expression. Sowohl männliche als auch weibliche PWD wiesen im Vergleich zu B6 eine geringere Expression der Proteine auf, die die Energiegewinnung beeinträchtigten. Aber auch im Vergleich der männlichen PWD gegen die männlichen B6 konnten Proteine klassifiziert werden, die den kontraktilem Apparat beeinflussten.

CS bilden ein wertvolles Modellsystem, um den Effekt unterschiedlicher Sets von varianten Genen und Proteinen zu analysieren. In CS wird ein Chromosom eines Stammes (B6) durch das homologe Chromosom eines anderen Stammes (PWD) ausgetauscht. Nach der Untersuchung von 5 männlichen und 5 weiblichen CS konnte festgestellt werden, dass bei weiblichen CS-Mäusen viele Proteine vermindert exprimiert, bei männlichen CS-Mäuse dagegen überwiegend überexprimiert waren. Das zeigte sich nicht nur bei den Polymorphismus-varianten Proteinen, sondern auch bei den geschlechtsspezifisch-varianten

Proteinen. Andererseits zeigte sich, dass das gleiche Protein oder der gleiche Phänotyp bei unterschiedlichen CS unterschiedlich große Diskrepanz zwischen männlichen und weiblichen Tieren zeigen kann. Das bedeutet, dass die geschlechtsspezifisch-varianten Proteine nicht von den geschlechtsrelevanten Hormonen abhängen, sondern auch unter dem Einfluss der Gene stehen.

Der Austausch des Chromosom 14 (CS14) bei den konsomischen Mausstämmen zeigte im Vergleich zu den anderen Stämmen die meisten Proteinveränderungen. Aufgrund dessen wurde dieser Stamm für das Krankheitsmodell, die drucklastinduzierte Hypertrophie gewählt. Ausschlaggebend für den erwarteten Effekt können nur die SNPs sein, die über das PWD-Chromosom in die B6-Tiere transferiert wurden und dort entweder genspezifische Wirkung zeigten oder durch Transvarianten Netzwerkeffekte zu anderen Genen und Proteinen ausbildeten. Nach der funktionellen Klassifizierung der veränderten Proteine offenbarten sich Abweichungen im Energiestoffwechsel und in den kontraktilen Fasern. Die Ergebnisse führten aber auch zu der Hypothese, dass die Chromosomen in ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung an polymorphen Genen einen unterschiedlichen Grad an Transaktionen und Variationen im Proteom zulassen (Unterschiede in der Pufferkapazität des Proteoms).

Nach einer 9-wöchigen transversalen Aortenkonstriktion (TAC) zeigten sowohl CS14 als auch B6 phänotypische Merkmale einer Hypertrophie, wobei die männlichen CS14 eine bessere Ejektionsfraktion (EF) besaßen. Sie scheinen die Einflüsse der Hypertrophie besser zu kompensieren als die Kontrolltiere. Dieses Phänomen zeigte sich auch auf Proteinebene. Vorallem in der oxidativen Phosphorylierung waren diese positiven Abweichungen zwischen B6 und CS14 während der Hypertrophie zu erkennen. Auch bei der Ausbildung der drucklastinduzierten Myokardhypertrophie gab es geschlechtsspezifische Unterschiede. Männliche CS14 tendierten zu einer besseren Kompensation der Hypertrophie-Entwicklung als weibliche CS14. Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Dieser Trend der Anpassung, konnte anhand der veränderten Proteine im Bereich des kontraktilen Apparates bestätigt werden.

Die dargestellten Untersuchungen zeigten, dass Geschlechterunterschiede in der Ausprägung von Herzhypertrophie nicht nur auf bekannten geschlechtsspezifischen Faktoren wie Sexualhormonen beruhen, sondern auch unter genetischen Einfluss (Polymorphismen) stehen. Die großen Unterschiede im Ausmaß der Variabilität der Proteine, die zwischen den verschiedenen konsomischen Stämmen gefunden wurden, legen den Verdacht nahe, dass auch Art und Ausmaß der Vernetzung der Proteine die Ausprägung von Krankheiten modifizieren kann. Das sollen vergleichende Untersuchungen von Herzhypertrophie bei CS14 und CS12 in zukünftigen Studien zeigen.

6 SUMMARY

The aim of this study was to investigate the influence of sex-specific factors on the development of myocardial hypertrophy, in particular the influence of single nucleotide polymorphisms (SNP) on the degree of sex-specificity on the proteomic and phenotypic level.

The sexual development is based on the gene of sex-determining region of Y (SRY). SRY is located on Y chromosome and is responsible for the gonadal development. The sex-specific hormones testosterone and estrogen are important for the sexual development and affect the incidence of cardiovascular diseases. To analyze genetic influences, consomic strains (CS) and their parental strains were investigated for proteomic and phenotypic traits. In the present work the effect of the genetic background in different individuals (polymorphisms) on sex-specificity of heart diseases (myocardial hypertrophy) were investigated.

The parental strains *M. m. domesticus* (C57BL/6 (B6)) and *M. m. musculus* (PWD/Ph (PWD)) showed significant differences in their cardiac phenotype ($p < 0.05$). Based on echocardiographic parameters of the diastole and systole of intraventricular septum (IVSd and IVSs) and leftventricular posterior wall (LVPWd and LVPWs), the heart was significantly increased in male and female PWD vs. B6 mice. In contrast, a significant decrease was detected in PWD vs. B6 mice in the leftventricular intradiameter (LVIDd and LVIDs). These differences could be shown not only on the phenotypic level, but also on the proteomic and mRNA-expression level. Here, proteins for energy production were decreased in male and female PWD vs. B6 mice, but only in male PWD vs B6 mice proteins of contractile fibers were identified.

CS are useful models to analyze the influence of gene and protein variants. In CS one chromosome of an inbred strain (B6) is replaced by the homologous chromosome of another inbred strain (PWD). In this investigation of 5 males and 5 females CS, female mice showed a decreased level of proteins, whereas male mice showed increased level of proteins. These effects could also be shown for sex-specific protein variants in male mice. On the other hand the same protein or the same phenotype showed different discrepancy between male and female mice in different CS. So, sex-specific protein variants do not only depend on sex-specific hormones but also on genetic factors.

Compared to other CS, the replacement of chromosome 14 (CS14) showed the greatest change in protein expression. Therefore, CS14 was taken as a model for myocardial hypertrophy. The expected effects can only be determined by the distribution of the SNPs on the replaced chromosome 14, which have either genetic effects or build networks of transvariants to other genes and proteins. The functional classification of the detected

proteins revealed variations in energy metabolisms and contractile fibers. These results lead to the hypothesis, that the composition of polymorphic genes on the chromosomes influences different degrees of transactions and variations of the proteome (differences in the buffer capacity of the proteome).

After 9 weeks of the transversal aortic constriction (TAC), CS14 and B6 mice showed a myocardial hypertrophic phenotype. Male CS14 mice showed a higher ejection fraction (EF) compared to B6 mice. It seems that male CS14 mice compensate the myocardial hypertrophy better than the control group of B6 mice. This phenomenon could also be shown in the protein pattern. Differences were detected in particular in the proteins of the oxidative phosphorylation. Male CS14 mice showed a tendency to better compensate the development of hypertrophy than female CS14 mice. However, this sex-specific discrepancy was not significant. This phenomenon could be confirmed by the protein pattern of the contractile apparatus.

Here we show that sex-differences in the development of myocardial hypertrophy are influenced by sexual hormones (testosterone and estrogen) and genetic factors (SNPs). The high numbers of differences in the proteome between the CS suggest that the composition and the degree of protein networks modify the development of the disease. This hypothesis should be validated by comparative analysis of CS12 and CS14 mice in the disease model of transversal aortic constriction.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Braun, S.S., R *Herz-Kreislauf-Erkrankungen*. Springer Medizin Verlag 2006. **39**: p. 354-361.
2. Gohlke, H., [*The global risk for cardiovascular disease. Who is a candidate for pharmacological prevention?*]. *Z Kardiol*, 2004. **93 Suppl 2**: p. II1-7.
3. Gasser R, K.W., Vidalli S, *MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN*. *Journal of Cardiology*, 2001. **8(5)**: p. 149-152.
4. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. *N Engl J Med*, 1990. **322(22)**: p. 1561-6.
5. Peivandi A.a., L.K., Vahl CF, *Die Signaltransduktion der konzentrischen Myokardhypertrophie*. *Z Herz- Thorax- Gefäßschir Verlag*, 2009. **23**: p. 9-16.
6. Frey, N., et al., *Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?* *Circulation*, 2004. **109(13)**: p. 1580-9.
7. Lips, D.J., et al., *Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy*. *Eur Heart J*, 2003. **24(10)**: p. 883-96.
8. Joachim Weil, H.S., *Pathophysiologie der chronischen HErzinsuffizienz*. *Clin Res Cardiol*, 2006. **4(95)**: p. 1-17.
9. Ritchie, R.H. and L.M. Delbridge, *Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect?* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006. **33(1-2)**: p. 159-66.
10. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance*. *J Clin Invest*, 2005. **115(3)**: p. 547-55.
11. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 45-79.
12. Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart*. *Circ Res*, 2002. **90(5)**: p. 520-30.
13. Meijs, M.F., et al., *Left ventricular hypertrophy: a shift in paradigm*. *Curr Med Chem*, 2007. **14(2)**: p. 157-71.
14. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. *Circulation*, 2000. **102(4)**: p. 470-9.
15. Schwartzbauer, G. and J. Robbins, *Matters of sex: sex matters*. *Circulation*, 2001. **104(12)**: p. 1333-5.
16. Wang, X., et al., *Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. **207(2 Suppl)**: p. 84-90.
17. Sham, P.C., S.S. Cherny, and S. Purcell, *Application of genome-wide SNP data for uncovering pairwise relationships and quantitative trait loci*. *Genetica*, 2009. **136(2)**: p. 237-43.
18. Morita, H., J. Seidman, and C.E. Seidman, *Genetic causes of human heart failure*. *J Clin Invest*, 2005. **115(3)**: p. 518-26.
19. Meder B, K.H., Rottbauer W, *Genetik der hypertrophischen Kardiomyopathie*. *J Kardiol*, 2009. **16(7-8)**: p. 274-278.
20. Fatkin, D. and R.M. Graham, *Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies*. *Physiol Rev*, 2002. **82(4)**: p. 945-80.
21. Jarcho, J.A., et al., *Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1*. *N Engl J Med*, 1989. **321(20)**: p. 1372-8.
22. Geisterfer-Lowrance, A.A., et al., *A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation*. *Cell*, 1990. **62(5)**: p. 999-1006.

23. Niimura, H., et al., *Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1998. **338**(18): p. 1248-57.
24. Richard, P., et al., *Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy*. Circulation, 2003. **107**(17): p. 2227-32.
25. Payer, B. and J.T. Lee, *X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 733-72.
26. Barr, M.L. and E.G. Bertram, *A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis*. Nature, 1949. **163**(4148): p. 676.
27. Sinclair, A.H., et al., *A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 240-4.
28. Löwel H, M.C., *Epidemiologie und demographische Entwicklung am Beispiel kardiovaskulären Erkrankungen in Deutschland*. Med Klin, 2006. **101**(10): p. 804-11.
29. Bundesamt, S., *Sterbetafel Deutschland 2002-2008*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt (www.gbe-bund.de), 2010.
30. Rosamond, W., et al., *Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2008. **117**(4): p. e25-146.
31. Thom, T., et al., *Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2006. **113**(6): p. e85-151.
32. Silber, D.H., *Heart failure in women*. Curr Womens Health Rep, 2003. **3**(2): p. 104-9.
33. Dannenberg, A.L., D. Levy, and R.J. Garrison, *Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study)*. Am J Cardiol, 1989. **64**(16): p. 1066-8.
34. Olivetti, G., et al., *Gender differences and aging: effects on the human heart*. J Am Coll Cardiol, 1995. **26**(4): p. 1068-79.
35. Laughlin, G.A. and E. Barrett-Connor, *Sexual dimorphism in the influence of advanced aging on adrenal hormone levels: the Rancho Bernardo Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(10): p. 3561-8.
36. Sluijmer, A.V., et al., *Endocrine activity of the postmenopausal ovary: the effects of pituitary down-regulation and oophorectomy*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(7): p. 2163-7.
37. Hayward, C.S., C.M. Webb, and P. Collins, *Effect of sex hormones on cardiac mass*. Lancet, 2001. **357**(9265): p. 1354-6.
38. Hayward, C.S., R.P. Kelly, and P. Collins, *The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(1): p. 28-49.
39. de Simone, G., et al., *Gender differences in left ventricular growth*. Hypertension, 1995. **26**(6 Pt 1): p. 979-83.
40. DeStefano, A.L., et al., *Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study*. Hypertension, 2004. **44**(2): p. 152-5.
41. Fox, C.S., et al., *Sex-specific association between estrogen receptor-alpha gene variation and measures of adiposity: the Framingham Heart Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(11): p. 6257-62.
42. Cleland, J.G., et al., *The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis*. Eur Heart J, 2003. **24**(5): p. 442-63.
43. Carroll, J.D., et al., *Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly*. Circulation, 1992. **86**(4): p. 1099-107.

44. Villari, B., et al., *Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload*. Eur Heart J, 1995. **16**(10): p. 1410-9.
45. Kostkiewicz, M., et al., *Left ventricular geometry and function in patients with aortic stenosis: gender differences*. Int J Cardiol, 1999. **71**(1): p. 57-61.
46. Aurigemma, G.P. and W.H. Gaasch, *Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle*. Cardiology, 1995. **86**(4): p. 310-7.
47. Krumholz, H.M., M. Larson, and D. Levy, *Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension*. Am J Cardiol, 1993. **72**(3): p. 310-3.
48. Bhatia, R.S., et al., *Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 260-9.
49. Owan, T.E., et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 251-9.
50. Regitz-Zagrosek, V., E. Lehmkuhl, and H.B. Lehmkuhl, *[Heart failure--are there gender aspects?]*. Internist (Berl), 2008. **49**(4): p. 422-6, 428.
51. Regitz-Zagrosek, V., et al., *Gender aspects in heart failure. Pathophysiology and medical therapy*. Arch Mal Coeur Vaiss, 2004. **97**(9): p. 899-908.
52. Mendes, L.A., et al., *The gender paradox*. Rev Port Cardiol, 1999. **18 Suppl 3**: p. III21-4.
53. Farquhar, C.M., et al., *Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(3): p. CD004143.
54. Leinwand, L.A., *Sex is a potent modifier of the cardiovascular system*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 302-7.
55. Hulley, S.B. and D. Grady, *The WHI estrogen-alone trial--do things look any better?* JAMA, 2004. **291**(14): p. 1769-71.
56. Schonfelder, G., *The biological impact of estrogens on gender differences in congestive heart failure*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(4): p. 573-4.
57. Grady, D., *Postmenopausal hormones--therapy for symptoms only*. N Engl J Med, 2003. **348**(19): p. 1835-7.
58. Liao, Y., et al., *Left ventricular hypertrophy has a greater impact on survival in women than in men*. Circulation, 1995. **92**(4): p. 805-10.
59. Bloom, W.a.F., DW, *Textbook of Histology*. Saunders, Philadelphia, 1994.
60. Kreis, T.a.V., R *Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford University Press, Oxford, 1999.
61. Schaub, M.C., et al., *Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 381-404.
62. Huxley, H.E., *The mechanism of muscular contraction*. Science 164:1356-1366, 1969. Clin Orthop Relat Res, 2002(403 Suppl): p. S6-17.
63. Holmes, K.C. and M.A. Geeves, *The structural basis of muscle contraction*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2000. **355**(1396): p. 419-31.
64. Hodge, T. and M.J. Cope, *A myosin family tree*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3353-4.
65. Crick, F., *The packing of alpha-helices: simple coiled-coils*. Acta Crystallogr, 1953. **6**: p. 689-697.
66. McLachlan, A.D. and M. Stewart, *Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure*. J Mol Biol, 1975. **98**(2): p. 293-304.
67. Lehman, W., et al., *Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electron microscopy and three-dimensional reconstruction*. J Mol Biol, 2001. **307**(3): p. 739-44.
68. Tesson, F., et al., *Genotype-phenotype analysis in four families with mutations in beta-myosin heavy chain gene responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy*. Hum Mutat, 1998. **12**(6): p. 385-92.
69. Nakajima-Taniguchi, C., et al., *A novel deletion mutation in the beta-myosin heavy chain gene found in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(12): p. 2607-12.

70. Marian, A.J., et al., *Detection of a new mutation in the beta-myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 1992. **90**(6): p. 2156-65.
71. Seidman, C., *Hypertrophy cardiomyopathy: from man to mouse*. J Clin Invest, 2000. **106**: p. S9-13.
72. Anan, R., et al., *Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 280-5.
73. Cuda, G., et al., *A previously undescribed de novo insertion-deletion mutation in the beta myosin heavy chain gene in a kindred with familial hypertrophic cardiomyopathy*. Heart, 1996. **76**(5): p. 451-2.
74. Dausse, E., et al., *Familial hypertrophic cardiomyopathy. Microsatellite haplotyping and identification of a hot spot for mutations in the beta-myosin heavy chain gene*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2807-13.
75. Burghardt, T.P., et al., *Myosin individualized: single nucleotide polymorphisms in energy transduction*. BMC Genomics. **11**: p. 172.
76. Luckey, S.W., et al., *Blocking cardiac growth in hypertrophic cardiomyopathy induces cardiac dysfunction and decreased survival only in males*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H838-45.
77. Bing, R.J., *The metabolism of the heart*. Harvey Lect, 1954. **50**: p. 27-70.
78. Bing, R.J., et al., *Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism*. Am J Med, 1954. **16**(4): p. 504-15.
79. Neely, J.R., M.J. Rovetto, and J.F. Oram, *Myocardial utilization of carbohydrate and lipids*. Prog Cardiovasc Dis, 1972. **15**(3): p. 289-329.
80. Lockwood, E.A. and E. Bailey, *Fatty acid utilization during development of the rat*. Biochem J, 1970. **120**(1): p. 49-54.
81. Finck, B.N., et al., *Regulatory networks controlling mitochondrial energy production in the developing, hypertrophied, and diabetic heart*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. **67**: p. 371-82.
82. Sack, M.N., et al., *Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart*. Circulation, 1996. **94**(11): p. 2837-42.
83. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
84. Kelly, D.P. and R.C. Scarpulla, *Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 357-68.
85. Feige, J.N., et al., *From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(2): p. 120-59.
86. Gilde, A.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism*. Circ Res, 2003. **92**(5): p. 518-24.
87. Hihi, A.K., L. Michalik, and W. Wahli, *PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(5): p. 790-8.
88. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Nuclear receptor signaling and cardiac energetics*. Circ Res, 2004. **95**(6): p. 568-78.
89. Finck, B.N., *The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 269-77.
90. Michalik, L., et al., *Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice*. J Cell Biol, 2001. **154**(4): p. 799-814.
91. Michalik, L. and W. Wahli, *Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 598-606.
92. Asakawa, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo*. Circulation, 2002. **105**(10): p. 1240-6.

93. Ding, G., et al., *Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage*. Cardiovasc Res, 2007. **76**(2): p. 269-79.
94. Cheng, L., et al., *Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy*. Nat Med, 2004. **10**(11): p. 1245-50.
95. Smeets, P.J., et al., *Cardiac hypertrophy is enhanced in PPAR alpha-/- mice in response to chronic pressure overload*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(1): p. 79-89.
96. Hsieh, Y.C., et al., *Inhibition of cardiac PGC-1alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage*. FASEB J, 2006. **20**(8): p. 1109-17.
97. Jamshidi, Y., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension*. Circulation, 2002. **105**(8): p. 950-5.
98. Cheurfa, N., et al., *The Gly482Ser polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene is associated with hypertension in type 2 diabetic men*. Diabetologia, 2004. **47**(11): p. 1980-3.
99. Valve, R., et al., *Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(10): p. 3708-12.
100. Simon, I., et al., *Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is associated with increased leptin levels in women with type-2 diabetes mellitus*. Horm Res, 2002. **58**(3): p. 143-9.
101. Djouadi, F., et al., *A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice*. J Clin Invest, 1998. **102**(6): p. 1083-91.
102. Nohammer, C., et al., *Myocardial dysfunction and male mortality in peroxisome proliferator-activated receptor alpha knockout mice overexpressing lipoprotein lipase in muscle*. Lab Invest, 2003. **83**(2): p. 259-69.
103. Yan, L., et al., *Gender-specific proteomic alterations in glycolytic and mitochondrial pathways in aging monkey hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(5): p. 921-9.
104. Davisson, M.T., *Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes*. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Gene, 1994. **147**(2): p. 157-60.
105. Staats, J., *Standardized nomenclature for inbred strains of mice: seventh listing for the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice*. Cancer Res, 1980. **40**(7): p. 2083-128.
106. Green, A., *On relative survival as a measure in prognosis evaluation*. Dan Med Bull, 1981. **28**(6): p. 260-3.
107. Yu, H.T. and Y.H. Peng, *Population differentiation and gene flow revealed by microsatellite DNA markers in the house mouse (Mus musculus castaneus) in Taiwan*. Zoolog Sci, 2002. **19**(4): p. 475-83.
108. Gregorova, S. and J. Forejt, *PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of Mus m. musculus subspecies--a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms*. Folia Biol (Praha), 2000. **46**(1): p. 31-41.
109. Boursot P, D.W., Anand R, Darviche D, Dod B, von Deimling F, Talwar GP, Bonhomme F, J Evol Biol, 1996. **9**: p. 391-415.
110. Silver, L., *Mouse Genetics. Concept and Applications* (Oxford New York: Oxford University Press), 1995.
111. Fernandes, C., et al., *Behavioral characterization of wild derived male mice (Mus musculus musculus) of the PWD/Ph inbred strain: high exploration compared to C57BL/6J*. Behav Genet, 2004. **34**(6): p. 621-30.
112. Cowley, A.W., Jr., R.J. Roman, and H.J. Jacob, *Application of chromosomal substitution techniques in gene-function discovery*. J Physiol, 2004. **554**(Pt 1): p. 46-55.

113. Cowley, A.W., Jr., *The genetic dissection of essential hypertension*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(11): p. 829-40.
114. Gregorova, S., et al., *Mouse consomic strains: exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies*. Genome Res, 2008. **18**(3): p. 509-15.
115. Singer, J.B., et al., *Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice*. Science, 2004. **304**(5669): p. 445-8.
116. Singer, J.B., et al., *Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice*. Genetics, 2005. **169**(2): p. 855-62.
117. Krewson, T.D., et al., *Chromosomes 6 and 13 harbor genes that regulate pubertal timing in mouse chromosome substitution strains*. Endocrinology, 2004. **145**(10): p. 4447-51.
118. Shockley, K.R. and G.A. Churchill, *Gene expression analysis of mouse chromosome substitution strains*. Mamm Genome, 2006. **17**(6): p. 598-614.
119. Takada, T., et al., *Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits*. Genome Res, 2008. **18**(3): p. 500-8.
120. Nadeau, J.H., et al., *Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains*. Nat Genet, 2000. **24**(3): p. 221-5.
121. Lander, E.S. and D. Botstein, *Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps*. Genetics, 1989. **121**(1): p. 185-99.
122. Guenet, J.L. and F. Bonhomme, *Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model*. Trends Genet, 2003. **19**(1): p. 24-31.
123. Zabel, C. and J. Klose, *High-resolution large-gel 2DE*. Methods Mol Biol, 2009. **519**: p. 311-38.
124. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals*. Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-43.
125. Nebrich, G., et al., *High MS-compatibility of silver nitrate-stained protein spots from 2-DE gels using ZipPlates and AnchorChips for successful protein identification*. Electrophoresis, 2007. **28**(10): p. 1607-14.
126. Luhn, S., et al., *Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images*. Proteomics, 2003. **3**(7): p. 1117-27.
127. Suckau, D., et al., *A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics*. Anal Bioanal Chem, 2003. **376**(7): p. 952-65.
128. Chernushevich, I.V., A.V. Loboda, and B.A. Thomson, *An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2001. **36**(8): p. 849-65.
129. Huang da, W., et al., *The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists*. Genome Biol, 2007. **8**(9): p. R183.
130. Collins, K.A., C.E. Korcarz, and R.M. Lang, *Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice*. Physiol Genomics, 2003. **13**(3): p. 227-39.
131. Korcarz, C.E., et al., *Doppler echocardiographic reference values for healthy rhesus monkeys under ketamine hydrochloride sedation*. J Med Primatol, 1997. **26**(6): p. 287-98.
132. Aurigemma, G.P., et al., *Noninvasive assessment of left ventricular mass, chamber volume, and contractile function*. Curr Probl Cardiol, 1995. **20**(6): p. 361-440.
133. Takimoto, E., et al., *Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 214-22.
134. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 8277-81.
135. Fliegner, D., *Geschlechterunterschiede bei drucklast-induzierter Myokardhypertrophie im Mausmodell - Einfluß von Östrogenrezeptor β* . 2008.

136. Witt, H., et al., *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(9): p. 1013-24.
137. Deschepper, C.F., et al., *Characterization of blood pressure and morphological traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains*. J Appl Physiol, 2004. **97**(1): p. 369-76.
138. de Simone, G., et al., *Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension: the MAVI Study*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 470-6.
139. Paigen, K. and J.T. Eppig, *A mouse phenome project*. Mamm Genome, 2000. **11**(9): p. 715-7.
140. Shoemaker, J.E., et al., *Fathead minnow steroidogenesis: in silico analyses reveals tradeoffs between nominal target efficacy and robustness to cross-talk*. BMC Syst Biol. **4**: p. 89.
141. Busk, O.L., et al., *Relative quantification of the proteomic changes associated with the mycotoxin zearalenone in the H295R steroidogenesis model*. Toxicon. **58**(6-7): p. 533-42.
142. Mao, L., et al., *Proteomic shifts in embryonic stem cells with gene dose modifications suggest the presence of balancer proteins in protein regulatory networks*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1218.
143. Yun, A.J., P.Y. Lee, and J.D. Doux, *Efficient inefficiency: biochemical "junk" may represent molecular bridesmaids awaiting emergent function as a buffer against environmental fluctuation*. Med Hypotheses, 2006. **67**(4): p. 914-21.
144. Leong, H.S., et al., *Glycolysis and pyruvate oxidation in cardiac hypertrophy--why so unbalanced?* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003. **135**(4): p. 499-513.
145. Jullig, M., et al., *Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats*. Proteomics, 2008. **8**(12): p. 2556-72.
146. Chu, G., et al., *Proteomic analysis of hyperdynamic mouse hearts with enhanced sarcoplasmic reticulum calcium cycling*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1725-7.
147. Lam, L., et al., *Differential protein expression profiling of myocardial tissue in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol. **48**(5): p. 1014-22.
148. Lucas, D.T., et al., *Alterations in mitochondrial function in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H575-83.
149. Petkov, P.M., et al., *Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse*. Genomics, 2004. **83**(5): p. 902-11.
150. Miyata, S., et al., *Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart*. Circ Res, 2000. **86**(4): p. 386-90.
151. Morkin, E., *Control of cardiac myosin heavy chain gene expression*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(6): p. 522-31.
152. Carniel, E., et al., *Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy*. Circulation, 2005. **112**(1): p. 54-9.
153. Abraham, W.T., et al., *Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype*. Mol Med, 2002. **8**(11): p. 750-60.
154. Huang, Y., H. Liu, and Y. Li, *Alterations in myosin heavy chain isoform gene expression during the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in rats*. Chin Med J (Engl), 2001. **114**(2): p. 183-5.
155. Heilig, R., et al., *The DNA sequence and analysis of human chromosome 14*. Nature, 2003. **421**(6923): p. 601-7.
156. Lowes, B.D., et al., *Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2315-24.
157. Kueppers, F. and J. Mills, *Trypsin inhibition by mouse serum: sexual dimorphism controlled by testosterone*. Science, 1983. **219**(4581): p. 182-4.

158. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med, 1999. **340**(23): p. 1801-11.
159. Kannel, W.B. and P.W. Wilson, *Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage*. Arch Intern Med, 1995. **155**(1): p. 57-61.
160. Chen, J.Q., et al., *Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(10): p. 1540-70.
161. Trahair, T., et al., *Myosin light chain gene expression associated with disease states of the human heart*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(5): p. 577-85.
162. Bovill, E., et al., *Induction by left ventricular overload and left ventricular failure of the human Jumonji gene (JARID2) encoding a protein that regulates transcription and reexpression of a protective fetal program*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. **136**(3): p. 709-16.
163. Scheuer, J., et al., *Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts*. Circ Res, 1987. **61**(1): p. 12-9.
164. Babiker, F.A., et al., *Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1524-30.
165. Matsuo, T., et al., *Mechanisms of cardiac hypertrophy in canine volume overload*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 2): p. H65-74.
166. Nagatomo, Y., et al., *Translational mechanisms accelerate the rate of protein synthesis during canine pressure-overload hypertrophy*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. H2176-84.
167. Imamura, T., et al., *Acute changes in myosin heavy chain synthesis rate in pressure versus volume overload*. Circ Res, 1994. **75**(3): p. 418-25.
168. Dool, J.S., et al., *Regional myosin heavy chain expression in volume and pressure overload induced cardiac hypertrophy*. Acta Physiol Scand, 1995. **155**(4): p. 396-404.
169. Lopaschuk, G.D., et al., *Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1213**(3): p. 263-76.
170. Dyck, J.R. and G.D. Lopaschuk, *Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(9): p. 1099-109.
171. Bishop, S.P. and R.A. Altschuld, *Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure*. Am J Physiol, 1970. **218**(1): p. 153-9.
172. Zamorano-Leon, J.J., et al., *A proteomic approach to determine changes in proteins involved in the myocardial metabolism in left ventricles of spontaneously hypertensive rats*. Cell Physiol Biochem. **25**(2-3): p. 347-58.
173. Johnson, J.D., W.W. Muhonen, and D.O. Lambeth, *Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeon. The enzymes incorporate the same alpha-subunit*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27573-9.
174. Flegner, D., et al., *Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **298**(6): p. R1597-606.
175. Barry, S.P. and P.A. Townsend, *What causes a broken heart--molecular insights into heart failure*. Int Rev Cell Mol Biol. **284**: p. 113-79.
176. Lygate, C.A., et al., *Serial high resolution 3D-MRI after aortic banding in mice: band internalization is a source of variability in the hypertrophic response*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(1): p. 8-16.
177. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling*. Hypertension. 2007 Feb;49(2):241-8. Epub 2006 Dec 26.

ANHANG

Tabelle 18: Echokardiographische Daten der parentalen unbehandelten Gruppen, männlich 11 Wochen alt

B6: C57BL/6, PWD: PWD/Ph, F1: F1(B6 x PWD), IVS: intraventrikuläres Septum, LVID: linksventrikulärer Intradiameter, LVPW: linksventrikuläre Hinterwand, d: Diastole, s: Systole, LVM: linksventrikuläre Masse, KG: Körpergewicht, EF: Auswurffraktion, ANOVA, Post Hoc, Dunnett: *p<0,05 vs. B6; #p<0,05 vs. PWD.

Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)	LVM/KG	EF (%)
B6	0,6 ± 0,08	4,1 ± 0,24	0,6 ± 0,09	0,8 ± 0,09	3,3 ± 0,25	0,8 ± 0,11	4,2 ± 0,60	42,4 ± 4,95
PWD	0,75 ± 0,05*	3,51 ± 0,27*	0,78 ± 0,06*	1,02 ± 0,10*	2,44 ± 0,40*	1,06 ± 0,15*	5,22 ± 0,47*	58,88 ± 10,53*
F1	0,73 ± 0,03*	4,21 ± 0,23 [#]	0,73 ± 0,03	0,96 ± 0,04*	3,38 ± 0,30 [#]	0,92 ± 0,05	4,43 ± 0,54	40,85 ± 7,11 [#]

Tabelle 19: Echokardiographische Daten der parentalen unbehandelten Gruppen, weiblich 11 Wochen alt

B6: C57BL/6, PWD: PWD/Ph, F1: F1(B6 x PWD), IVS: intraventrikuläres Septum, LVID: linksventrikulärer Intradiameter, LVPW: linksventrikuläre Hinterwand, d: Diastole, s: Systole, LVM: linksventrikuläre Masse, KG: Körpergewicht, EF: Auswurffraktion, ANOVA, Post Hoc, Dunnett: *p<0,05 vs. B6; #p<0,05 vs. PWD.

Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)	LVM/KG	EF (%)
B6	0,7 ± 0,10	4,0 ± 0,36	0,7 ± 0,10	0,8 ± 1,12	3,1 ± 0,33	0,9 ± 0,18	5,1 ± 0,75	46,3 ± 7,10
PWD	0,81 ± 0,08*	3,20 ± 0,53*	0,84 ± 0,10*	1,19 ± 0,13*	1,96 ± 0,63*	1,12 ± 0,15*	5,44 ± 0,96	70,89 ± 12,39*
F1	0,72 ± 0,01	4,35 ± 0,62 [#]	0,73 ± 0,02	0,94 ± 0,05	3,49 ± 0,71 [#]	0,93 ± 0,06	6,26 ± 1,41	41,79 ± 10,88 [#]

Tabelle 20: Identifizierungsinformationen zu den bei den männlichen parentalen Stämmen versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen

Stamm_Spot-ID	p-Wert	Ratio St./B6	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	Gematchte Peptide	Masse	pI
PWD_71_0	0,046	1,34	Acyl-coenzyme A thioesterase 2	12	ACOT2_MOUSE	Q9QYR9	Acot2	7	80	2	49621	6,91
PWD_97_2	0,001	0,45	Actin, aortic smooth muscle	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
PWD_14_95	0,000	0,21	Apolipoprotein A-I	9	APOA1_MOUSE	Q00623	Apoa1	21	471	5	30569	5,64
PWD_14_84	0,019	2,63	Apolipoprotein A-I	9	APOA1_MOUSE	Q00623	Apoa1	21	471	5	30569	5,64
PWD_13_96	0,009	1,21	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	11	GDIR1_MOUSE	Q99PT1	Arhgdia	30	426	5	23393	5,12
PWD_46_3	0,001	0,67	ATPase family AAA domain-containing protein 3	4	ATAD3_MOUSE	Q92511	Atad3	19	177	5	66701	9,32
PWD_99_7	0,026	1,68	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
PWD_13_75	0,000	0,63	Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	17	CLPP_MOUSE	O88696	Clpp	15	164	3	29781	7,05
PWD_13_32	0,049	0,72	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5	5	COQ5_MOUSE	Q9CXI0	Coq5	6	101	3	37312	7,14
PWD_99_3	0,001	0,43	ATP synthase subunit gamma	4	DECR_MOUSE	Q91VR2	Decr1	16	343	9	36191	9,1
PWD_77_9	0,004	1,37	Aspartate aminotransferase	19	AATC_MOUSE	P05201	Got1	16	175	4	46202	6,68

PWD_79 6	0,028	0,7	Glyoxylate reductase/ hydroxypyruvate reductase	4	GRHPR_MOUSE	Q91Z53	Grhpr	6	88	2	35306	6,0
PWD_16 46	0,012	1,35	Hemoglobin subunit alpha	11	HBA_MOUSE	P01942	Hba	24	148	3	15076	7,96
PWD_13 94	0,034	1,4	Heat shock protein beta-1	5	HSPB1_MOUSE	P14602	Hsbp1	51	832	9	23000	6,12
PWD_12 48	0,010	1,29	Acyl-protein thioesterase 1	1	LYPA1_MOUSE	P97823	Lypla1	9	102	2	24671	6,14
PWD_15 68	0,014	0,69	Protein LZIC	4	LZIC_MOUSE	Q8K3C3	Lzic	25	452	5	21523	4,90
PWD_72 7	0,043	0,61	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
PWD_72 5	0,035	0,5	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
PWD_72 9	0,029	0,48	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	1	119	0	223426	5,57
PWD_73 8	0,023	0,53	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	617	8	223426	5,57
PWD_77 9	0,010	0,53	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	710	9	223426	5,57
PWD_69 5	0,010	1,87	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	1	NDUAA_MOUSE	Q99LC3	Ndufa10	18	418	6	40578	7,63
PWD_12 09	0,014	0,73	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	17	NDUBA_MOUSE	Q9DCS9	Ndufb10	21	177	4	21010	8,19
PWD_14	0,040	0,61	NADH dehydrogenase	13	NDUS4_MOUSE	Q9CXZ1	Ndufs4	11	65	2	19772	10,0

22			[ubiquinone] iron-sulfur protein 4									
PWD_14 12	0,000	2,51	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	19	PRDX3_MOUSE	P20108	Prdx3	21	293	5	28109	7,15
PWD_75 5	0,000	0,44	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina 1a	6	64	3	45974	5,44
PWD_76 0	0,000	0,46	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina 1a	3	97	2	45974	5,44
PWD_75 6	0,000	0,4	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina 1d	10	128	5	45969	5,24
PWD_76 1	0,000	0,63	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	13	320	6	45862	5,44
PWD_76 4	0,010	0,69	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	16	423	8	45862	5,44
PWD_76 2	0,005	1,57	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	12	319	6	45862	5,44
PWD_80 4	0,007	0,66	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	14	545	6	45862	5,44
PWD_80 8	0,026	1,3	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	16	423	8	45862	5,44
PWD_80 3	0,024	0,66	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	13	320	6	45862	5,44
PWD_79 9	0,012	0,57	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	12	319	6	45862	5,44
PWD_14 09	0,009	0,72	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5	UCHL1_MOUSE	Q9R0P9	Uchl1	9	65	2	24822	5,14
PWD_95	0,003	0,74	Voltage-dependent anion-	11	VDAC1_MOUSE	Q60932	Vdac1	69	2534	16	32331	8,55

6			selective channel protein 1									
F1_936	0,017	1,29	Actin, aortic smooth muscle	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
F1_1417	0,006	0,79	Apolipoprotein A-I	9	APOA1_MOUSE	Q00623	Apoa1	21	471	5	30569	5,64
F1_1338	0,000	1,28	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	11	GDIR1_MOUSE	Q99PT1	Arhgdia	30	426	5	23393	5,12
F1_1059	0,016	1,37	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
F1_1461	0,018	1,6	Chaperone activity of bc1 complex-like	1	ADCK3_MOUSE	Q60936	Cabc1	6	229	2	71697	6,10
F1_1482	0,045	1,42	Cofilin-1	19	COF1_MOUSE	P18760	Cfl1	10	83	2	18548	8,22
F1_1264	0,015	0,74	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5	5	COQ5_MOUSE	Q9CXI0	Coq5	6	101	2	37312	7,14
F1_1789	0,019	1,23	Cytochrome c oxidase subunit 7A2	9	CX7A2_MOUSE	P48771	Cox7a2	27	147	2	9285	10,28
F1_811	0,008	0,76	Citrate synthase	10	CISY_MOUSE	Q9CZU6	Cs	11	234	3	51703	8,72
F1_1070	0,007	0,66	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	4	DECR_MOUSE	Q9CQ62	Decr1	16	343	6	36191	9,1
F1_914	0,018	1,26	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	4	GRHPR_MOUSE	Q91Z53	Grhpr	6	88	2	35306	6,0
F1_1096	0,007	0,57	Glutathione S-transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1	16	159	2	27480	6,92
F1_1356	0,006	1,32	Heat shock protein beta-1	5	HSPB1_MOUSE	P14602	Hspb1	51	832	9	23000	6,12
F1_1488	0,006	1,3	Heat shock protein beta-7	4	HSPB7_MOUSE	P35385	Hspb7	24	214	3	18610	5,84

F1_739	0,021	0,75	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	7	IDHP_MOUSE	P54071	Idh2	37	970	15	58735	8,88
F1_981	0,003	1,24	Myozenin-2	3	MYOZ2_MOUSE	Q9JJW5	Myoz2	15	116	2	29743	8,53
F1_841	0,006	1,34	Protein NDRG2	14	NDRG2_MOUSE	Q9QYG0	Ndrg2	6	101	2	40763	5,23
F1_696	0,024	1,46	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1	19	NDUV1_MOUSE	Q91YT0	Ndufv1	18	285	7	79098	8,51
F1_1484	0,003	0,6	Nucleoside diphosphate kinase B	11	NDKB_MOUSE	Q01768	Nme2	28	151	3	17352	6,97
F1_1084	0,015	1,52	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdim5	6	142	3	63289	8,61
F1_1085	0,014	1,26	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdim5	4	149	2	63289	8,61
F1_1410	0,029	1,58	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	19	PEBP1_MOUSE	P70296	Pebp1	11	102	2	20817	5,19
F1_1452	0,046	1,31	Peroxiredoxin-2	8	PRDX2_MOUSE	Q61171	Prdx2	38	338	7	21765	5,20
F1_1359	0,005	2,03	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	19	PRDX3_MOUSE	P20108	Prdx3	21	293	5	28109	7,15
F1_674	0,008	0,65	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina1a	6	64	3	45974	5,44
F1_666	0,026	0,52	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina1a	2	97	3	45974	5,44
F1_670	0,000	0,43	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	10	128	5	45969	5,24
F1_672	0,001	0,51	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina1e	13	320	6	45862	5,44
F1_706	0,000	0,42	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina1e	16	423	8	45862	5,44
F1_1352	0,049	1,32	Sepiapterin reductase	6	SPRE_MOUSE	Q64105	Spr	20	166	5	27865	5,58

F1_1145	0,015	1,31	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	48	661	14	24244	9,57
F1_707	0,035	1,31	Tubulin beta-2C chain	2	TBB2C_MOUSE	P68372	Tubb2c	18	501	6	49799	4,79

Tabelle 21: Identifizierungsinformationen zu den bei den männlichen F1 versus PWD unterschiedlich exprimierten Proteinen

Stamm_Spot-ID	p-Wert	Ratio St./B6	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pl
F1_889	0,005	1,64	Acyl-coenzyme A thioesterase 2	12	ACOT2_MOUSE	Q9QYR9	Acot2	7	80	2	49621	6,91
F1_590	0,008	1,79	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	4	AL4A1_MOUSE	Q8CHT0	Aldh4a1	14	425	7	61772	8,58
F1_1278	0,009	1,31	Carbonic anhydrase 2	3	CAH2_MOUSE	P00920	Car2	28	372	6	29015	6,49
F1_1396	0,023	0,73	ES1 protein homolog	10	ES1_MOUSE	Q9D172	D10Jhu81e	6	84	2	28073	9,00
F1_1196	0,006	1,88	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	4	DECR_MOUSE	Q9CQ62	Decr1	16	343	6	36191	9,10
F1_1382	0,032	1,3	Protein NipSnap homolog 2	5	NIPS2_MOUSE	O55126	Gbas	12	261	4	32912	9,31
F1_1217	0,000	3,95	Glutathione S-transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1	16	159	2	27480	6,92
F1_1317	0,045	1,36	Estradiol 17-beta-dehydrogenase	17	DHB8_MOUSE	P50171	Hsd17b	23	311	4	26629	6,10

			8Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8				8					
F1_1528	0,002	1,26	Heat shock protein beta-1	5	HSPB1_MOUSE	P14602	Hspb1	51	832	9	23000	6,12
F1_1605	0,012	1,47	Heat shock protein beta-6	7	HSPB6_MOUSE	Q5EBG6	Hspb6	20	187	3	17510	5,64
F1_839	0,039	0,78	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1	IDHC_MOUSE	O88844	ldh1	7	147	3	46630	6,48
F1_888	0,000	1,48	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	2	IVD_MOUSE	Q9JHI5	lvd	7	137	12	46296	8,53
F1_574	0,042	0,59	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
F1_567	0,011	0,55	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
F1_551	0,044	0,61	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	791	16	223426	5,57
F1_507	0,037	0,66	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	54	223426	5,57
F1_471	0,036	0,63	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	421	11	223426	5,57
F1_1735	0,039	1,29	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1	10	NDUAC_MOUSE	Q7TMF3	Ndufa12	44	258	5	17076	9,38
F1_1392	0,039	1,41	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	17	NDUBA_MOUSE	Q9DCS9	Ndufb10	21	177	4	21010	8,19

Tabelle 22: Identifizierungsinformationen zu den bei den weiblichen parentalen Stämme versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen

Stamm_Spot-ID	p-Wert	Ratio St./B6	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pI
PWD_55 7	0,049	1,35	3-ketoacyl-CoA thiolasa	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
PWD_40 7	0,033	0,47	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	4	AL4A1_MOUSE	Q8CHT0	Aldh4a1	14	425	7	61772	8,58
PWD_79 0	0,048	0,58	Annexin A1	19	ANXA1_MOUSE	P10107	Anxa1	8	302	2	38710	6,97
PWD_92 4	0,046	0,74	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
PWD_15 96	0,016	0,6	Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	17	CLPP_MOUSE	O88696	Clpp	15	164	3	29781	7,05
PWD_89 3	0,038	0,49	Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase, mitochondrial	4	COQ3_MOUSE	Q8BMS4	Coq3	2	42	2	40931	8,07
PWD_94 1	0,022	0,55	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	4	DECR_MOUSE	Q9CQ62	Decr1	16	343	6	36191	9,1
PWD_10 79	0,001	0,71	Glutathione S-transferase Mu 1	3	GSTM1_MOUSE	P10649	Gstm1	27	536	7	25953	7,71

PWD_14 89	0,017	1,3	Hemoglobin subunit alpha	11	HBA_MOUSE	P01942	Hba	24	148	3	15076	7,96
PWD_14 76	0,029	1,48	Hemoglobin subunit alpha	11	HBA_MOUSE	P01942	Hba	24	148	3	15076	7,96
PWD_11 28	0,017	0,72	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	17	NDUBA_MOUSE	Q9DCS9	Ndufb10	17	160	3	21010	8,19
PWD_76 8	0,010	0,4	Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	13	PECI_MOUSE	Q9WUR2	Peci	7	141	2	43240	9,08
PWD_11 12	0,006	0,67	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	3	PPIA_MOUSE	P17742	Ppia	39	424	11	17960	7,74
PWD_93 0	0,043	0,67	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	14	545	6	45862	5,44
PWD_84 2	0,045	1,96	Serine protease inhibitor A3M		SPA3M_MOUSE	Q03734	Serpina 3m	7	211	2	46974	5,35
PWD_91 3	0,011	0,6	Voltage-dependent anion- selective channel protein 1	11	VDAC1_MOUSE	Q60932	Vdac1	10	184	3	32331	8,55
F1_648	0,013	1,31	3-ketoacyl-CoA thiolase	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2					

F1_1211	0,022	1,34	Actin, aortic smooth muscle	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
F1_1931	0,044	0,77	Apolipoprotein A-I	9	APOA1_MOUSE	Q00623	Apoa1	21	471	5	30569	5,64
F1_431	0,000	0,72	ATPase family AAA domain-containing protein 3	4	ATAD3_MOUSE	Q92511	Atad3	19	199	5	66701	9,32
F1_985	0,043	1,23	ATP synthase subunit gamma	2	ATPG_MOUSE	Q91VR2	Atp5c1	4	119	2	32865	9,06
F1_973	0,040	1,32	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
F1_1714	0,000	0,61	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, mitochondrial	5	COQ5_MOUSE	Q9CXI0	Coq5	3	101	2	37312	7,14
F1_1015	0,013	1,36	Desmin	1	DESM_MOUSE	P31001	Des	22	340	6	53465	5,21
F1_599	0,002	0,79	Beta-enolase	11	ENOB_MOUSE	P21550	Eno3	28	1007	9	46995	6,73
F1_1006	0,000	0,54	Glutathione S-transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1					
F1_621	0,001	1,3	Trifunctional enzyme subunit beta	5	ECHB_MOUSE	Q99JY0	Hadhb	40	1100	25	51353	9,43
F1_1707	0,026	0,73	Ribonuclease UK114	15	UK114_MOUSE	P52760	Hrsp12	18	154	2	14247	8,74
F1_2048	0,024	1,6	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86

F1_672	0,026	1,63	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	1	NDUS1_MOUSE	Q91VD9	Ndufs1	6	121	4	79698	5,51
F1_700	0,024	1,25	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	1	NDUS1_MOUSE	Q91VD9	Ndufs1	4	76	3	79698	5,51
F1_1658	0,034	0,63	Omega-amidase NIT2	16	NIT2_MOUSE	Q9JHW2	Nit2	8	129	2	30483	6,44
F1_1441	0,001	0,77	Nucleoside diphosphate kinase B	11	NDKB_MOUSE	Q01768	Nme2	28	151	3	17352	6,97
F1_1036	0,045	0,78	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdim5	6	142	3	63289	8,61
F1_1829	0,019	1,4	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	19	PRDX3_MOUSE	P20108	Prdx3	21	293	5	28109	7,15
F1_1154	0,040	0,61	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	19	PRDX3_MOUSE	P20108	Prdx3	19	303	7	28109	7,15
F1_1260	0,000	1,41	Prostaglandin reductase 2	12	PTGR2_MOUSE	Q8VDQ1	Ptgr2	7	98	2	37991	5,27
F1_828	0,007	0,78	Reticulon-4-interacting protein 1	10	RT4I1_MOUSE	Q924D0	Rtn4ip1	26	539	8	43344	9,29
F1_934	0,001	0,72	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina 1d	10	128	5	45969	5,24
F1_937	0,001	0,72	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	14	545	6	45862	5,44
F1_948	0,001	0,75	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina	16	423	8	45862	5,44

							1e					
F1_926	0,005	0,59	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	12	319	6	45862	5,44
F1_730	0,002	1,45	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	16	TRAP1_MOUSE	Q9CQN1	Trap1	9	296	6	80159	6,25
F1_1840	0,006	0,77	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5	UCHL1_MOUSE	Q9R0P9	Uchl1	9	65	2	24822	5,14

Tabelle 23: Identifizierungsinformationen zu den bei den weiblichen F1 versus PWD unterschiedlich exprimierten Proteinen

Stamm_Spot-ID	p-Wert	Ratio St./B6	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pI
F1_553	0,003	1,44	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	11	ACOX1_MOUSE	Q9R0H0	Acox1	3	164	2	74587	8,64
F1_1120	0,026	1,57	GTP:AMP phosphotransferase	19	KAD3_MOUSE	Q9WTP7	Ak3	42	429	9	25410	8,87
F1_921	0,035	1,53	Arsenite methyltransferase	19	AS3MT_MOUSE	Q91WU5	As3mt	9	103	2	41766	5,77
F1_472	0,018	0,76	ATP synthase subunit alpha	18	ATPA_MOUSE	Q03265	Atp5a1	29	959	12	59716	9,22
F1_1042	0,015	1,44	Methylglutaconyl-CoA hydratase	13	AUHM_MOUSE	Q9JLZ3	Auh	14	84	2	33374	9,57

F1_943	0,009	1,52	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
F1_1322	0,000	1,75	Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	17	CLPP_MOUSE	O88696	Clpp	15	164	3	29781	7,05
F1_551	0,039	1,26	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	12	COQ6_MOUSE	Q8R1S0	Coq6	14	120	3	50674	6,55
F1_673	0,018	0,77	Citrate synthase	10	CISY_MOUSE	Q9CZU6	Cs	12	234	3	51703	8,72
F1_954	0,011	1,72	2,4-dienoyl-CoA reductase	4	DECR_MOUSE	Q9CQ62	Decr1	16	343	6	36191	9,1
F1_1124	0,031	1,31	Protein NipSnap homolog 2	5	NIPS2_MOUSE	O55126	Gbas	15	261	4	32912	9,31
F1_572	0,041	1,33	Trifunctional enzyme subunit beta	5	ECHB_MOUSE	Q99JY0	Hadhb	40	1100	25	51353	9,43
F1_1618	0,001	0,6	Hemoglobin subunit alpha	11	HBA_MOUSE	P01942	Hba	24	148	3	15076	7,96
F1_707	0,045	1,31	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	12	219	4	60917	5,91
F1_701	0,016	1,28	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma	X	IDH3G_MOUSE	P70404	Idh3g	16	276	5	42758	9,17
F1_1039	0,012	1,36	L-lactate dehydrogenase B chain	6	LDHB_MOUSE	P16125	Ldhb	19	341	6	36549	5,70
F1_1328	0,003	1,31	Mitochondrial fission protein MTP18	11	MTP18_MOUSE	Q9CRB8	Mtp18	14	127	2	18303	8,74

F1_475	0,001	0,49	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	3	223426	5,57
F1_466	0,006	0,52	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
F1_465	0,032	0,52	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	791	16	223426	5,57
F1_406	0,046	0,32	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	27	223426	5,57
F1_405	0,046	0,51	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	421	11	223426	5,57
F1_404	0,036	0,54	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	11	1253	19	223426	5,57
F1_365	0,011	0,43	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	11	1122	18	223426	5,57
F1_389	0,042	0,57	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	13	1625	22	223426	5,57
F1_1523	0,041	1,43	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86
F1_1490	0,005	1,2	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	65	976	11	18852	4,86
F1_1351	0,003	1,46	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4	13	NDUS4_MOUSE	Q9CXZ1	Ndufs4	11	65	2	19772	10
F1_973	0,020	1,22	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdlim5	6	142	3	63289	8,61
F1_972	0,002	1,57	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdlim5	4	149	2	63289	8,61
F1_230	0,002	1,38	6-phosphofruktokinase	15	K6PF_MOUSE	P47857	Pfkm	15	359	7	85215	8,24

F1_1419	0,032	1,31	60S ribosomal protein L12	2	RL12_MOUSE	P35979	Rpl12	44	418	5	17794	9,48
F1_306	0,002	0,7	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	13	DHSA_MOUSE	Q8K2B3	Sdha	3	117	2	72539	7,06
F1_732	0,001	1,66	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina 1a	13	229	6	45974	5,44
F1_704	0,027	1,73	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina 1d	10	128	5	45969	5,24
F1_705	0,041	1,37	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	12	319	6	45862	5,44
F1_898	0,018	1,27	Voltage-dependent anion- selective channel protein 1	11	VDAC1_MOUSE	Q60932	Vdac1	10	184	3	32331	8,55
F1_1010	0,006	1,47	Voltage-dependent anion- selective channel protein 3	8	VDAC3_MOUSE	Q60931	Vdac3	8	137	2	30733	8,96
F1_289	0,022	1,4	WD repeat-containing protein 1	5	WDR1_MOUSE	O88342	Wdr1	10	78	2	66365	6,11

Tabelle 24: Identifizierungsinformationen zu den bei den männlichen CS versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen

CS_ Spot-ID	p-Wert	Ratio CS/B6	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen- name	Sequenz- abdecku- ng (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pl
----------------	--------	----------------	--------------	-----	------------------------	------------------	--------------	--------------------------------	----------------	----------------------	-------	----

C5_917	0,005	1,28	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial precursor	9	THIL_MOUSE	Q8QZT1	Acat1	45	1116	19	44787	8,71
C5_929	0,017	1,45	Annexin A2	9	ANXA2_MOUSE	P07356	Anxa2	6	142	2	38652	7,55
C5_1105	0,000	1,54	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	13	AUHM_MOUSE	Q9JLZ3	Auh	14	84	2	33374	9,57
C5_1001	0,043	1,25	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	15	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
C5_1659	0,019	1,45	Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial	1	ADCK3_MOUSE	Q60936	Cabc1	2	229	2	71697	6,10
C5_676	0,004	1,42	Beta-enolase	11	ENOB_MOUSE	P21550	Eno3	34	1258	15	46995	6,73
C5_670	0,014	2,38	Beta-enolase	11	ENOB_MOUSE	P21550	Eno3	28	1007	9	46995	6,73
C5_679	0,000	1,32	Beta-enolase	11	ENOB_MOUSE	P21550	Eno3	8	109	2	46995	6,73
C5_1829	0,040	0,76	Hemoglobin subunit beta-1 (Hemoglobin beta-1 chain)	7	HBB1_MOUSE	P02088	Hbb-b1	51	588	7	15830	7,12
C5_1528	0,016	1,43	Heat shock factor-binding protein 1	8	HSPB1_MOUSE	Q9CQZ1	Hspb1	51	88	2	35306	6,0
C5_1633	0,013	1,69	Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform	11	MLRA_MOUSE	Q9QVP4	Myl7	38	796	7	19438	4,76

C5_1768	0,032	0,64	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	7	NDUC2_MOUSE	Q9CQ54	Ndufc2	18	158	6	14154	9,24
C5_649	0,010	1,58	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1	13	NDUV1_MOUSE	Q91YT0	Ndufv1	18	285	7	50802	8,51
C5_955	0,024	1,25	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor	7	OAT_MOUSE	P29758	Oat	16	303	4	48324	6,19
C5_784	0,006	0,67	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina 1a	13	355	6	45974	5,44
C5_793	0,003	0,78	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	12	319	6	45862	5,44
C5_727	0,037	0,81	Serine protease inhibitor A3M		SPA3M_MOUSE	Q03734	Serpina 3m	7	187	2	46974	5,35
C5_1533	0,002	0,64	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5	UCHL1_MOUSE	Q9R0P9	Uchl1	9	65	2	24822	5,14
C12_280 7	0,000	0,54	Beta-enolase	11	ENOB_MOUSE	P21550	Eno3	8	109	2	46995	6,73
C12_355 5	0,003	1,33	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	9	IDH3A_MOUSE	Q9D6R2	Idh3a	10	165	3	39613	6,27

C12_321 6	0,010	0,72	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdim5	6	142	3	63289	8,61
C12_296 3	0,034	1,35	Reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial precursor	10	RT4I1_MOUSE	Q924D0	Rtn4ip1	26	539	8	43344	9,29
C12_322 2	0,002	0,64	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina 1a	3	54	2	45974	5,44
C12_321 1	0,015	0,53	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina 1a	13	229	6	45974	5,44
C12_321 7	0,017	0,66	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina 1e	16	423	8	45862	5,44
C12_312 7	0,017	0,65	Serine protease inhibitor A3M		SPA3M_MOUSE	Q03734	Serpina 3m	7	187	2	46974	5,35
C14_726	0,026	1,58	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial precursor	9	THIL_MOUSE	Q8QZT1	Acat1	45	1116	19	44787	8,71
C14_107 3	0,006	1,34	GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	19	KAD3_MOUSE	Q9WTP7	Ak3	42	429	9	25410	8,87
C14_326 8	0,004	1,29	Apolipoprotein A-I precursor (Apo- AI) (ApoA-I)	9	APOA1_MOUSE	Q00623	Apoa1	21	471	5	30569	5,64

C14_121 1	0,038	1,50	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	18	ATPA_MOUSE	Q03265	Atp5a1	29	959	12	59716	9,22
C14_578	0,041	1,50	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	18	ATPA_MOUSE	Q03265	Atp5a1	5	144	2	59716	9,22
C14_105 6	0,039	1,39	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3	6	CHCH3_MOUSE	Q9CRB9	Chchd3	49	1039	16	26318	8,56
C14_352 8	0,041	0,79	Fatty acid-binding protein, heart (H-FABP)	4	FABPH_MOUSE	P11404	Fabp3	24	79	2	14810	6,11
C14_320 0	0,030	0,67	Heat shock factor-binding protein 1	8	HSPB1_MOUSE	Q9CQZ1	Hspb1	51	832	9	23000	6,12
C14_710	0,018	1,27	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma	X	IDH3G_MOUSE	P70404	ldh3g	16	276	5	42758	9,17
C14_715	0,021	1,3	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma	X	IDH3G_MOUSE	P70404	ldh3g	4	86	2	42758	9,17
C14_110 4	0,015	1,42	MACRO domain-containing protein 1	19	MACD1_MOUSE	Q922B1	Macrod 1	9	181	3	35272	9,07
C14_129 64	0,035	0,66	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	12	1408	21	223426	5,57
C14_129 77	0,016	0,56	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1228	19	223426	5,57

C14_129 82	0,024	0,59	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	813	13	223426	5,57
C14_130 12	0,001	0,53	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	12	1255	19	223426	5,57
C14_130 52	0,034	0,62	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	839	14	223426	5,57
C14_130 53	0,026	0,41	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	12	914	19	223426	5,57
C14- 13058	0,040	0,61	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	12	1498	12	223426	5,57
C14_130 62	0,023	0,52	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1125	17	223426	5,57
C14_130 63	0,008	0,55	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	1300	15	223426	5,57
C14_130 67	0,022	0,41	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	7	722	12	223426	5,57
C14_130 75	0,021	0,62	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	12	1123	22	223426	5,57
C14_130 79	0,016	0,44	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1458	18	223426	5,57

C14_130 90	0,003	0,60	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	1044	13	223426	5,57
C14_130 91	0,011	0,57	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	646	16	223426	5,57
C14_130 97	0,010	0,59	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	13	1625	22	223426	5,57
C14_131 06	0,002	0,59	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	11	1122	18	223426	5,57
C14_131 10	0,048	0,52	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	11	1253	19	223426	5,57
C14_131 20	0,009	0,49	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	421	11	223426	5,57
C14_131 27	0,006	0,54	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	27	223426	5,57
C14_131 34	0,026	0,54	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	791	16	223426	5,57
C14_131 50	0,002	0,53	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
C14_131 61	0,008	0,48	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57

C14_131 63	0,000	0,48	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	12	1255	19	223426	5,57
C14_131 64	0,040	0,47	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	990	16	223426	5,57
C14_131 66	0,005	0,44	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	709	11	223426	5,57
C14_131 71	0,006	↓0,50	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	586	8	223426	5,57
C14_131 72	0,042	0,48	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	696	11	223426	5,57
C14_131 83	0,002	0,44	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	616	11	223426	5,57
C14_131 86	0,031	0,52	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	1098	17	223426	5,57
C14_131 91	0,008	0,51	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	674	11	223426	5,57
C14_131 93	0,019	0,55	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	674	11	223426	5,57
C14_131 96	0,008	0,45	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1243	20	223426	5,57

C14_132 02	0,002	0,60	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	700	10	223426	5,57
C14_132 03	0,011	0,47	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	481	8	223426	5,57
C14_132 12	0,025	0,52	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1163	18	223426	5,57
C14_132 18	0,000	0,72	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	14	1551	24	223426	5,57
C14_170 50	0,014	0,46	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1026	17	223426	5,57
C14_182 24	0,044	0,54	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1144	18	223426	5,57
C14_174 87	0,021	0,56	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	11	1100	19	223426	5,57
C14_183 29	0,027	0,53	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	922	15	223426	5,57
C14_184 17	0,019	0,50	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	537	8	223426	5,57
C14_186 08	0,033	0,60	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	749	10	223426	5,57

C14_196 05	0,002	0,51	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	1036	15	223426	5,57
C14_197 97	0,019	0,38	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1163	18	223426	5,57
C14_199 72	0,001	0,56	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	14	1551	24	223426	5,57
C14_201 49	0,028	0,50	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1026	17	223426	5,57
C14_203 76	0,044	0,56	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1144	18	223426	5,57
C14_204 64	0,015	0,43	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	11	1100	19	223426	5,57
C14_337 8	0,044	1,37	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86
C14_287 1	0,024	1,35	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1)	9	MYL3_MOUSE	P09542	Myl3	29	252	5	18852	4,86
C14_152 0	0,021	1,37	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	7	NDUC2_MOUSE	Q9CQ54	Ndufc2	18	158	2	14154	9,24
C14_234 8	0,049	1,75	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	1	NDUS1_MOUSE	Q91VD9	Ndufs1	6	121	4	79698	5,51

C19_824	0,013	0,54	Annexin A1	19	ANXA1_MOUSE	P10107	Anxa1	8	302	2	38710	6,97
C19_576 3	0,043	0,62	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	10	ATPD_MOUSE	Q9D3D9	Atp5d	20	934	5	17589	5,03
C19_606	0,001	1,38	Alpha-enolase	18	ENOA_MOUSE	P17182	Eno1	12	607	3	47111	6,37
C19_489 3	0,030	0,82	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	3	175	2	60917	5,91
C19_148 8	0,029	0,81	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	7	NDUC2_MOUSE	Q9CQ54	Ndufc2	18	158	2	15154	9,24
C19_144 4	0,032	0,80	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4	13	NDUS4_MOUSE	Q9CXZ1	Ndufs4	11	65	2	19772	10
C19_174 1	0,047	0,73	Ubiquitin - Mus musculus (Mouse)	5	UBIQ_MOUSE	P62991	Ubb					
C19_485 1	0,004	1,73	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina 1a	6	64	3	45974	5,44
C19_485 6	0,005	1,43	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina 1d	10	128	5	45969	5,24
C19_483 1	0,039	1,74	Serine protease inhibitor A3M		SPA3M_MOUSE	Q03734	Serpina 3m	10	254	3	56974	5,35

Tabelle 25: Identifizierungsinformationen zu den bei den weiblichen CS versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen

CS_Spot-ID	p-Wert	Ratio St./B6	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pI
C5_1099	0,011	1,40	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
C5_814	0,005	0,62	Apolipoprotein O	X	APOO_MOUSE	Q9DCZ4	Apoo	12	107	2	24121	9,06
C5_1780	0,047	0,61	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	10	ATPD_MOUSE	Q9D3D9	Atp5d	13	140	2	17589	5,03
C5_1892	0,037	1,66	Hemoglobin subunit alpha (Hemoglobin alpha chain)	11	HBA_MOUSE	P01942	Hba	24	148	3	15076	7,96
C5_543	0,040	1,42	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1	IDHC_MOUSE	O88844	Idh1	7	147	3	46630	6,48
C5_700	0,032	1,53	Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial	4	MECR_MOUSE	Q9DCS3	Mecr	15	264	4	40317	9,17
C5_1663	0,040	0,76	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86
C5_1265	0,040	1,45	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	7	NDUC2_MOUSE	Q9CQ54	Ndufc2	18	158	2	14154	9,24
C5_1117	0,029	0,69	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4	13	NDUS4_MOUSE	Q9CXZ1	Ndufs4	11	65	2	19772	10,0

C5_833	0,000	0,52	PDZ and LIM domain protein 5 (Enigma homolog)	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdim5	6	142	3	63289	8,61
C5_1581	0,021	0,83	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP-1)	19	PEBP1_MOUSE	P70296	Pebp1	11	102	2	20817	5,19
C5_1139	0,000	0,61	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial	14	PPIF_MOUSE	Q99KR7	Ppif	28	311	5	21723	9,32
C5_1144	0,000	0,66	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	14	PPIF_MOUSE	Q99KR7	Ppif	9	100	3	21723	9,32
C5_1108	0,011	0,60	60S ribosomal protein L12	2	RL12_MOUSE	P35979	Rpl12	44	418	5	17794	9,48
C5_842	0,016	0,67	40S ribosomal protein S3	7	RS3_MOUSE	P62908	Rps3	23	313	4	26657	9,68
C5_816	0,042	0,77	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1 d	10	128	5	45969	5,24
C5_1498	0,000	0,44	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5	UCHL1_MOUSE	Q9R0P9	Uchl1	9	65	2	24822	5,14
C5_823	0,025	0,53	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	8	VDAC3_MOUSE	Q60931	Vdac3	8	137	2	30733	8,96
C12_2554	0,029	1,74	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
C12_2908	0,010	0,74	D-beta-hydroxybutyrate	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14

			dehydrogenase									
C12_3486	0,035	1,25	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	9	IDH3A_MOUSE	Q9D6R2	Idh3a	10	165	3	396133	6,27
C12_3747	0,017	0,72	Macrophage migration inhibitory factor	10	MIF_MOUSE	P34884	Mif	15	65	2	12496	6,79
C12_2618	0,035	0,73	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	1	NDUAA_MOUSE	Q99LC3	Ndufa10	18	418	6	40578	7,63
C12_3671	0,044	1,25	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	7	NDUC2_MOUSE	Q9CQ54	Ndufc2	18	158	2	14154	9,24
C12_3225	0,001	1,76	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina1 a	3	97	2	45974	5,44
C12_3171	0,028	0,72	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina1 a	13	229	6	45974	5,44
C12_3178	0,005	0,75	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1 d	10	128	5	45969	5,24
C12_3497	0,024	1,45	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	6	STRAP_MOUSE	Q9Z1Z2	Strap	8	287	2	38418	4,99
C12_3404	0,031	0,81	Troponin T, cardiac muscle (TnTc)	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
C14_3185	0,020	1,27	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23

			actin-2)									
C14_885	0,000	0,64	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
C14_3859	0,017	1,47	UMP-CMP kinase	4	KCY_MOUSE	Q9DBP5	Cmpk1	10	126	2	22151	5,68
C14_1593	0,047	0,82	D-dopachrome decarboxylase	10	DOPD_MOUSE	O35215	Ddt	27	202	3	13069	6,09
C14_3336	0,045	0,81	Elongation factor 1-delta	15	EF1D_MOUSE	P57776	Eef1d	8	125	2	31274	4,91
C14_559	0,049	0,82	Beta-enolase	11	ENOB_MOUSE	P21550	Eno3	34	1258	15	46995	6,73
C14_2867	0,016	1,26	Fibrinogen beta chain	3	FIBB_MOUSE	Q8K0E8	Fgb	12	258	7	54718	6,68
C14_729	0,005	1,41	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	8	AATM_MOUSE	P05202	Got2	34	996	18	47381	9,13
C14_2552	0,012	1,69	Gelsolin	2	GELS_MOUSE	P13020	Gsn	7	314	4	85888	5,83
C14_2580	0,006	1,69	Gelsolin	2	GELS_MOUSE	P13020	Gsn	4	153	3	85888	5,83
C14_3490	0,030	0,72	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	17	DHB8_MOUSE	P50171	Hsd17b8	23	311	4	26629	6,1
C14_3234	0,010	1,3	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	9	IDH3A_MOUSE	Q9D6R2	Idh3a	10	165	3	39613	6,27
C14_673	0,008	1,52	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial	X	IDH3G_MOUSE	P70404	Idh3g	8	150	3	47381	9,13
C14_1189	0,027	1,62	Ribosome-recycling factor,	2	RRFM_MOUSE	Q9D6S7	Mrrf	17	314	3	29032	9,86

			mitochondrial									
C14_2857	0,002	0,81	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
C14_2885	0,003	0,47	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
C14_2864	0,000	0,31	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	617	8	223426	5,57
C14_2837	0,015	0,3	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	610	10	223426	5,57
C14_2869	0,000	0,26	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	797	10	223426	5,57
C14_2839	0,002	0,24	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	710	9	223426	5,57
C14_2840	0,000	0,22	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	7	865	14	223426	5,57
C14_1308	0,038	0,76	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	2	NDUA8_MOUSE	Q9DCJ5	Ndufa8	33	247	5	19979	8,76
C14_1383	0,016	1,48	Nucleoside diphosphate kinase B	11	NDKB_MOUSE	Q01768	Nme2	28	151	3	17352	6,97
C14_262	0,006	1,32	Polyadenylate-binding protein 1	15	PABP1_MOUSE	P29341	Pabpc1	13	146	4	70598	9,48
C14_1309	0,002	0,49	60S ribosomal protein L12	2	RL12_MOUSE	P35979	Rpl12	44	418	5	17794	9,48
C14_937	0,017	0,72	Epimerase family protein SDR39U1	14	D39U1_MOUSE	Q5M8N4	Sdr39u1	22	326	6	32974	9,07
C14_3190	0,001	0,53	Tropomodulin-3	9	TMOD3_MOUSE	Q9JHJ0	Tmod3	12	104	4	39478	5,02
C14_988	0,049	1,25	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	48	661	14	24244	9,57
C14_2705	0,024	0,76	Heat shock proetin 75 kDa, mitochondrial	16	TRAP1_MOUSE	Q9CQN1	Trap1	9	296	6	80159	6,25

C14_937	0,017	0,72	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	8	VDAC3_MOUSE	Q60931	Vdac3	9	163	2	30733	9,24
C14_3067	0,021	0,75	UPF0366 protein C11orf67 homolog	7	CK067_MOUSE	Q8R0P4	1810020 D17Rik	16	104	2	13236	7,77
C16_3749	0,032	1,82	Arsenite methyltransferase	19	AS3MT_MOUSE	Q91WU5	As3mt	9	103	2	41766	5,77
C16_2187	0,017	0,71	ATPase family AAA domain-containing protein 3	4	ATAD3_MOUSE	Q92511	Atad3	19	199	5	66701	9,32
C16_2751	0,002	1,53	Gluthathione S-transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1	16	159	2	27480	6,92
C16_3263	0,022	1,49	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	8	NDUB7_MOUSE	Q9CR61	Ndufb7	39	217	4	16320	8,35
C16_3536	0,032	1,43	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
C16_3510	0,030	1,52	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
C16_3489	0,013	2,49	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	617	8	223426	5,57
C16_3438	0,014	2,88	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	610	10	223426	5,57
C16_3472	0,014	2,84	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	797	10	223426	5,57
C16_3437	0,028	2,46	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	710	9	223426	5,57
C16_3412	0,003	4,33	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	7	865	14	223426	5,57

C19_1128	0,011	1,58	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
C19_1111	0,004	1,46	Arsenite methyltransferase	19	AS3MT_MOUSE	Q91WU5	As3mt	9	103	2	41766	5,77
C19_978	0,000	0,09	Glutathione transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1	16	159	2	27480	6,92
C19_1162	0,015	0,65	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	7	OAT_MOUSE	P29758	Oat	16	303	4	48324	6,19
C19_878	0,005	1,83	Alpha-1-antitrypsin 1-1	12	A1AT1_MOUSE	P07758	Serpina1a	3	54	2	45974	5,44
C19_1941	0,041	0,70	Alpha-synuclein	6	SYUA_MOUSE	O55042	Snca	28	160	3	14476	4,74
C19_261	0,014	1,38	WD repeat-containing protein 1	5	WDR1_MOUSE	O88342	Wdr1	10	78	2	66365	6,11

Tabelle 26: Echokardiographische Daten der männlichen Tiere, 9 Wochen nach TAC bzw. Sham

B6: C57BL/6, CS14: konsomischer Stamm 14, TAC: transversale Aortenkonstriktion, IVS: intraventrikuläres Septum, LVID: linksventrikulärer Intradiameter, LVPW: linksventrikuläre Hinterwand, d: Diastole, s: Systole, LVM: linksventrikuläre Masse, KG: Körpergewicht, EF: Auswurffraktion, ANOVA, Post Hoc, Dunnett: *p<0,05 vs. B6; #p<0,05 vs. Sham.

Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)	LVM/KG	EF (%)
--------	-----------	------------	------------	-----------	------------	------------	--------	--------

B6 + Sham	0,76 ± 0,01	4,11 ± 0,04	0,75 ± 0,01	1,04 ± 0,07	3,09 ± 0,09	1,04 ± 0,05	3,95 ± 0,28	49,36 ± 2,95
B6 + TAC	0,96 ± 0,06 [#]	4,10 ± 0,26	0,97 ± 0,04 [#]	1,06 ± 0,07	3,43 ± 0,21 [#]	1,04 ± 0,12	5,72 ± 0,81 [#]	34,70 ± 4,36 [#]
CS14 + Sham	0,79 ± 0,02*	3,94 ± 0,35*	0,81 ± 0,04*	1,01 ± 0,10*	2,70 ± 0,59	1,01 ± 0,06*	3,85 ± 0,89*	60,20 ± 12,88*
CS14 + TAC	0,94 ± 0,14*	3,87 ± 0,23*	1,01 ± 0,03* [#]	1,07 ± 0,09*	3,09 ± 0,18*	1,11 ± 0,12*	5,26 ± 0,25*	41,82 ± 0,65*

Tabelle 27: Echokardiographische Daten der weiblichen Tiere, 9 Wochen nach TAC bzw. Sham

B6: C57BL/6, CS14: konsomischer Stamm 14, IVS: intraventrikuläres Septum, LVID: linksventrikulärer Intradiameter, LVPW: linksventrikuläre Hinterwand, d: Diastole, s: Systole, LVM: linksventrikuläre Masse, KG: Körpergewicht, EF: Auswurfraction, ANOVA, Post Hoc, Dunnett: *p<0,05 vs. B6; [#]p<0,05 vs. Sham.

Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)	LVM/KG	EF (%)
B6 + Sham	0,85 ± 0,08	4,03 ± 0,11	0,89 ± 0,08	1,13 ± 0,12	3,01 ± 0,12	1,03 ± 0,07	5,76 ± 0,91	50,43 ± 4,53
B6 + TAC	1,18 ± 0,18 [#]	3,56 ± 0,15 [#]	1,21 ± 0,06 [#]	1,35 ± 0,11	2,86 ± 0,07	1,10 ± 0,08	7,60 ± 0,80 [#]	41,16 ± 3,38 [#]
CS14 + Sham	0,77 ± 0,03	3,83 ± 0,25	0,80 ± 0,03	1,04 ± 0,10	2,80 ± 0,27	1,05 ± 0,07	4,53 ± 0,34*	52,71 ± 9,37
CS14 + TAC	0,88 ± 0,10* [#]	3,90 ± 0,09	0,90 ± 0,11*	1,09 ± 0,15*	3,11 ± 0,20	1,00 ± 0,17	5,52 ± 0,70*	42,04 ± 6,11 [#]

Tabelle 28: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig vom Geschlecht (einfaktorielle ANOVA; p<0,05)

Spot-ID	p-Wert	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pl
---------	--------	--------------	-----	---------------------	---------------	----------	-----------------------	-------------	-------------------	-------	----

7348	0,016	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	7	865	14	223426	5,57
7357	0,010	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
7419	0,043	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7496	0,012	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	617	8	223426	5,57
7503	0,009	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	710	9	223426	5,57
7508	0,020	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	54	223426	5,57
7521	0,001	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
7534	0,039	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7769	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	10	128	5	45969	5,24
7777	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	13	320	6	45862	5,44
7779	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina1e	16	423	8	45862	5,44
7782	0,000	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	12	219	4	60917	5,91
7787	0,024	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	3	175	2	60917	5,91
7790	0,012	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina1e	16	423	8	45862	5,44
7800	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina1e	13	320	6	45862	5,44

7814	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	10	128	5	45969	5,24
7822	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT5_MOUSE	Q00897	Serpina1e	14	545	6	45862	5,44
7836	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	10	128	5	45969	5,24
7837	0,000	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina1e	12	319	6	45862	5,44
7883	0,027	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	10	ATPB_MOUSE	P56480	Atp5b	58	1694	30	56265	5,19
7941	0,007	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	9	QCR1_MOUSE	Q9CZ13	Uqcrc1	35	1542	17	52735	5,75
7964	0,005	Actin, aortic smooth muscle	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
7968	0,019	Actin, aortic smooth muscle	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
7994	0,001	Actin, aortic smooth muscle	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
7995	0,014	Actin, aortic smooth muscle	19	ACTA_MOUSE	P62737	Acta2	31	780	10	41982	5,23
8004	0,003	Lon protease homolog, mitochondrial		LONM_MOUSE	Q8CGK3	Lonp1	3	111	2	105776	6,15
8060	0,000	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8061	0,001	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8062	0,019	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98

8077	0,001	Apolipoprotein A-IV	9	APOA4_MOUSE	P06728	Apoa4	10	70	3	45001	5,41
8084	0,001	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8104	0,011	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	9	IDH3A_MOUSE	Q9D6R2	Idh3a	10	165	3	39613	6,27
8134	0,006	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	9	IDH3A_MOUSE	Q9D6R2	Idh3a	10	165	3	396133	6,27
8139	0,032	L-lactate dehydrogenase B chain	6	LDHB_MOUSE	P16125	Ldhb	19	341	6	36549	5,70
8188	0,035	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8193	0,016	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	14	ODPB_MOUSE	Q9D051	Pdhb	22	367	7	38912	6,41
8204	0,000	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	68	1606	27	32661	4,69
8209	0,002	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8210	0,001	Elongation factor 1-delta		EF1D_MOUSE	P57776	Eef1d	8	125	2	31274	4,91
8221	0,008	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	68	1606	27	32661	4,69
8359	0,001	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	8	COQ9_MOUSE	Q8K1Z0	Coq9	7	100	2	35061	5,6
8363	0,027	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	8	COQ9_MOUSE	Q8K1Z0	Coq9	19	249	6	35061	5,6

8399	0,025	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	17	DHB8_MOUSE	P50171	Hsd17b8	23	311	4	26629	6,10
8434	0,030	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, mitochondrial	5	COQ5_MOUSE	Q9CXI0	Coq5	6	101	3	37312	7,14
8529	0,046	Myosin light chain 3	9	MYL3_MOUSE	P09542	Myl3	29	252	5	18852	4,86
8532	0,001	Myosin light chain 3	9	MYL3_MOUSE	P09542	Myl3	29	252	5	18852	4,86
8537	0,016	Myosin light chain 3	9	MYL3_MOUSE	P09542	Myl3	29	252	5	18852	4,86
8603	0,024	ATP synthase subunit d, mitochondrial	11	ATP5H_MOUSE	Q9DCX2	Atp5h	13	161	4	18738	5,52
8604	0,021	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8	19	NDUFS8_MOUS E	Q8K3J1	Ndufs8	4	233	2	24023	5,9
8606	0,005	Apolipoprotein A-I	9	APOA1_MOUSE	Q00623	Apoa1	21	471	5	30569	5,64
8620	0,015	Proteasome subunit beta type-6	11	PSB6_MOUSE	Q60692	Psmb6	16	270	8	25362	4,97
8632	0,007	Phosphatidylethanolamine- binding protein 1	19	PEBP1_MOUSE	P70296	Pebp1	11	102	2	20817	5,19
8641	0,001	Peroxiredoxin-2	8	PRDX2_MOUSE	Q61171	Prdx2	38	338	7	21765	5,20

8695	0,002	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86
4248	0,029	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	4	AL4A1_MOUSE	Q8CHT0	Aldh4a1	14	425	7	61772	8,58
4250	0,035	Carnitine O-acetyltransferase	2	CACP_MOUSE	P47934	Crat	4	266	2	70879	8,52
4284	0,012	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	9	KPYM_MOUSE	P52480	Pkm2	11	643	8	57850	7,18
4286	0,003	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	9	KPYM_MOUSE	P52480	Pkm2	11	643	8	57850	7,18
4340	0,017	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	18	ATPA_MOUSE	Q03265	Atp5a1	29	959	12	59716	9,22
4411	0,015	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	5	ECHB_MOUSE	Q99JY0	Hadhb	40	1100	25	51353	9,43
4446	0,032	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
4580	0,000	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	6	SUCA_MOUSE	Q9WUM5	Suc1g1	9	148	3	34972	9,46
4583	0,006	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	G3P_MOUSE	P16858	Gapdh	8	232	2	35787	8,44
4589	0,001	Glyceraldehyde-3-phosphate	6	G3P_MOUSE	P16858	Gapdh	17	202	8	35787	8,44

		dehydrogenase										
4596	0,004	Malate dehydrogenase, mitochondrial	5	MDHM_MOUSE	P08249	Mdh2	16	232	7	35574	8,83	
4638	0,007	Malate dehydrogenase, mitochondrial	5	MDHM_MOUSE	P08249	Mdh2	3	174	2	35574	8,83	
4650	0,034	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	9	ETF_A_MOUSE	Q99LC5	Etfa	7	194	2	35018	8,62	
4666	0,000	Prohibitin-2	6	PHB2_MOUSE	O35129	Phb2	5	335	4	33276	9,83	
4671	0,000	Glutathione S-transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1	16	159	2	27480	6,92	
4677	0,002	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	3	HCDH_MOUSE	Q61425	Hadh	6	98	3	34442	8,76	
4683	0,000	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14	
4684	0,001	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	3	HCDH_MOUSE	Q61425	Hadh	6	92	3	34442	8,76	
4694	0,000	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	4	DECR_MOUSE	Q9CQ62	Decr1	16	343	6	36191	9,1	
4715	0,013	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdlim5	6	142	3	63289	8,61	

4737	0,000	Carbonic anhydrase 2	3	CAH2_MOUSE	P00920	Car2	28	372	6	29015	6,49
4738	0,000	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	48	661	14	24244	9,57
4741	0,001	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	14	161	2	24244	9,57
4745	0,000	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	17	GLO2_MOUSE	Q99KB8	Hagh	17	175	4	28883	6,50
4751	0,000	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	48	661	14	24244	9,57
4770	0,000	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	17	GLO2_MOUSE	Q99KB8	Hagh	17	175	4	28883	6,50
4782	0,000	ADP/ATP translocase 1	8	ADT1_MOUSE	P48962	Slc25a4	5	65	2	32883	9,73
4790	0,000	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	14	161	2	24244	9,57
4814	0,000	GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	19	KAD3_MOUSE	Q9WTP7	Ak3	42	429	9	25410	8,87
4821	0,000	Protein NipSnap homolog 2	5	NIPS2_MOUSE	O55126	Gbas	12	261	4	32912	9,31
4852	0,014	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	17	NDUBA_MOUSE	Q9DCS9	Ndufb10	21	177	4	21010	8,19
4928	0,006	Alpha-crystallin B chain	9	CRYAB_MOUSE	P23927	Cryab	16	430	8	20056	6,76
4984	0,006	NADH dehydrogenase	2	NDUA8_MOUSE	Q9DCJ5	Ndufa8	33	247	5	19979	8,76

		[ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8									
4987	0,049	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	2	NDUA8_MOUSE	Q9DCJ5	Ndufa8	33	247	5	19979	8,76
4988	0,039	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	2	NDUA8_MOUSE	Q9DCJ5	Ndufa8	33	247	5	19979	8,76
5004	0,012	Cofilin-1	19	COF1_MOUSE	P18760	Cf1	10	83	2	18548	8,22
5010	0,000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	13	NDUS4_MOUSE	Q9CXZ1	Ndufs4	11	65	2	19772	10,0
5019	0,034	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	132	3	21884	9,10
5035	0,000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	10	NDUAC_MOUSE	Q7TMF3	Ndufa12	44	258	5	17076	9,38
5040	0,022	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	20	284	4	17059	7,07
5041	0,004	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	20	176	3	17059	7,07
5055	0,002	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	14	593	6	17059	7,07

5098	0,000	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	11	HINT1_MOUSE	P70349	Hint1	18	121	2	13768	6,36
5099	0,003	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	13	ACO13_MOUSE	Q9CQR4	Acot13	16	130	2	15173	8,95
5132	0,044	Hemoglobin subunit beta-1	7	HBB1_MOUSE	P02088	Hbb-b1	51	588	7	15830	7,12
5138	0,010	Fatty acid-binding protein	6	FABPL_MOUSE	P12710	Fabp1	41	330	6	14236	8,59
5216	0,000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	6	NDUA4_MOUSE	Q62425	Ndufa4	39	223	4	9321	9,52
5287	0,040	Cytochrome c oxidase polypeptide 7A2, mitochondrial	9	CX7A2_MOUSE	P48771	Cox7a2	27	147	2	9285	10,28

Tabelle 29: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig vom Stamm (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$)

Spot-ID	p-Wert	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pI
7289	0,012	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	617	8	223426	5,57
7290	0,021	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	710	9	223426	5,57
7292	0,015	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	54	223426	5,57

7295	0,018	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
7297	0,011	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7328	0,002	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	990	16	223426	5,57
7339	0,005	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	709	11	223426	5,57
7348	0,010	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	7	865	14	223426	5,57
7355	0,014	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	586	8	223426	5,57
7357	0,004	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
7358	0,008	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	696	11	223426	5,57
7359	0,025	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	616	11	223426	5,57
7360	0,045	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	1098	17	223426	5,57
7366	0,024	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	674	11	223426	5,57
7373	0,003	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1243	20	223426	5,57
7379	0,020	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	700	10	223426	5,57
7380	0,019	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	481	8	223426	5,57
7381	0,036	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1163	18	223426	5,57
7395	0,037	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	14	1551	24	223426	5,57

7410	0,044	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1144	18	223426	5,57
7411	0,004	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	11	1100	19	223426	5,57
7414	0,042	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	922	15	223426	5,57
7418	0,023	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	537	8	223426	5,57
7419	0,018	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7420	0,012	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	749	10	223426	5,57
7421	0,002	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	1036	15	223426	5,57
7447	0,009	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1624	25	223426	5,57
7457	0,035	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	990	16	223426	5,57
7458	0,024	Gelsolin	2	GELS_MOUSE	P13020	Gsn	7	314	4	85888	5,83
7466	0,021	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	14	1551	24	223426	5,57
7484	0,004	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1026	17	223426	5,57
7500	0,008	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	749	10	223426	5,57
7517	0,036	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	481	8	223426	5,57
7528	0,003	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	1036	15	223426	5,57
7550	0,029	78 kDa glucose-regulated protein	2	GRP78_MOUSE	P20029	Hspa5	14	357	6	72377	5,92

7551	0,013	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	6	709	11	223426	5,57
7782	0,000	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	12	219	4	60917	5,91
7786	0,006	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	3	175	2	60917	5,91
7787	0,011	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	3	175	2	60917	5,91
7792	0,006	Vimentin	2	VIME_MOUSE	P20152	Vim	24	568	10	35655	5,06
7797	0,023	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	3	175	2	60917	5,91
7844	0,000	Desmin	1	DESM_MOUSE	P31001	Des	22	340	6	53465	5,21
7868	0,001	Desmin	1	DESM_MOUSE	P31001	Des	22	340	6	53465	5,21
7876	0,026	Desmin	1	DESM_MOUSE	P31001	Des	22	340	6	53465	5,21
7929	0,024	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	10	ATPB_MOUSE	P56480	Atp5b	58	1694	30	56265	5,19
7937	0,001	Adenosine kinase	14	ADK_MOUSE	P55264	Adk	5	45	3	40123	5,84
7941	0,020	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	9	QCR1_MOUSE	Q9CZ13	Uqcrc1	35	1542	17	52735	5,75

8011	0,034	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8060	0,041	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8061	0,001	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8077	0,000	Apolipoprotein A-IV	9	APOA4_MOUSE	P06728	Apoa4	10	70	3	45001	5,41
8084	0,003	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8100	0,021	Troponin T, cardiac muscle	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8196	0,033	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	14	ODPB_MOUSE	Q9D051	Pdhb	22	367	7	38912	6,41
8214	0,016	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	14	ODPB_MOUSE	Q9D051	Pdhb	22	367	7	38912	6,41
8522	0,041	Heat shock protein beta-1	5	HSPB1_MOUSE	P14602	Hsbp1	51	832	9	23000	6,12
8532	0,002	Myosin light chain 3	9	MYL3_MOUSE	P09542	Myl3	29	252	5	18852	4,86
8534	0,047	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	19	PRDX3_MOUSE	P20108	Prdx3	21	293	5	28109	7,15
8603	0,004	ATP synthase subunit d, mitochondrial	11	ATP5H_MOUSE	Q9DCX2	Atp5h	13	161	4	18738	5,52

8703	0,019	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86
8719	0,001	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	65	976	11	18852	4,86
8827	0,000	Galectin-1	15	LEG1_MOUSE	P16045	Lgals1	5	90	3	14856	5,32
4163	0,027	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial	2	ACS2L_MOUSE	Q99NB1	Acss1	14	336	6	74576	6,51
4187	0,016	WD repeat-containing protein 1	5	WDR1_MOUSE	O88342	Wdr1	10	78	2	66365	6,11
4250	0,032	Carnitine O-acetyltransferase	2	CACP_MOUSE	P47934	Crat	4	266	2	70879	8,52
4275	0,004	ATPase family AAA domain-containing protein 3	4	ATAD3_MOUSE	Q92511	Atad3	19	177	5	66701	9,32
4283	0,001	Dihydroliponamid dehydrogenase	12	DLDH_MOUSE	O08749	Dld	26	851	13	54238	7,99
4286	0,001	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	9	KPYM_MOUSE	P52480	Pkm2	11	643	8	57850	7,18
4411	0,013	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	5	ECHB_MOUSE	Q99JY0	Hadhb	40	1100	25	51353	9,43
4446	0,027	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
4538	0,002	Short-chain specific acyl-CoA	5	ACADS_MOUSE	Q07417	Acads	3	41	2	44918	8,96

		dehydrogenase, mitochondrial									
4564	0,001	Annexin A2	9	ANXA2_MOUSE	P07356	Anxa2	6	142	2	38652	7,55
4593	0,001	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	G3P_MOUSE	P16858	Gapdh	13	355	5	35787	8,44
4614	0,000	Myozenin-2	3	MYOZ2_MOUSE	Q9JJW5	Myoz2	15	116	2	29743	8,53
4620	0,040	Malate dehydrogenase, mitochondrial	5	MDHM_MOUSE	P08249	Mdh2	16	511	9	35574	8,83
4633	0,012	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	G3P_MOUSE	P16858	Gapdh	8	232	2	35787	8,44
4634	0,001	Myozenin-2	3	MYOZ2_MOUSE	Q9JJW5	Myoz2	15	116	2	29743	8,53
4638	0,021	Malate dehydrogenase, mitochondrial	5	MDHM_MOUSE	P08249	Mdh2	3	174	2	35574	8,83
4668	0,001	Myozenin-2	3	MYOZ2_MOUSE	Q9JJW5	Myoz2	15	116	2	29743	8,53
4671	0,004	Glutathione S-transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1	16	159	2	27480	6,92
4673	0,000	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	11	VDAC1_MOUSE	Q60932	Vdac1	69	2534	16	32331	8,55
4677	0,000	Hydroxyacyl-coenzyme A	3	HCDH_MOUSE	Q61425	Hadh	6	98	3	34442	8,76

		dehydrogenase, mitochondrial									
4687	0,000	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
4708	0,000	Glutathione S-transferase omega-1	19	GSTO1_MOUSE	O09131	Gsto1	16	159	2	27480	6,92
4728	0,045	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	8	VDAC3_MOUSE	Q60931	Vdac3	8	137	2	30733	8,96
4737	0,008	Carbonic anhydrase 2	3	CAH2_MOUSE	P00920	Car2	28	372	6	29015	6,49
4745	0,000	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	17	GLO2_MOUSE	Q99KB8	Hagh	17	175	4	28883	6,50
4750	0,001	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	48	661	14	24244	9,57
4790	0,039	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	14	161	2	24244	9,57
4826	0,035	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	19	PRDX3_MOUSE	P20108	Prdx3	21	293	5	28109	7,15
4835	0,004	Triosephosphate isomerase	6	TPIS_MOUSE	P17751	Tpi1	22	389	6	26696	6,9
4838	0,047	Triosephosphate isomerase	6	TPIS_MOUSE	P17751	Tpi1	22	389	6	26696	6,9
4875	0,035	Glutathione S-transferase P 1	19	GSTP1_MOUSE	P19157	Gstp1	46	1411	31	23594	7,68
4900	0,002	Superoxide dismutase [Mn],	17	SODM_MOUSE	P09671	Sod2	7	100	2	24855	8,8

		mitochondrial									
4904	0,001	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	17	SODM_MOUSE	P09671	Sod2	7	100	2	25488	8,8
4685	0,006	Cofilin-2	12	COF2_MOUSE	P45591	Cfl2	23	185	3	18698	7,66
5010	0,001	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	13	NDUS4_MOUSE	Q9CXZ1	Ndufs4	11	65	2	19772	10,0
5027	0,003	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	8	NDUB7_MOUSE	Q9CR61	Ndufb7	39	217	4	16320	8,35
5034	0,025	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	16	SODC_MOUSE	P08228	Sod1	40	257	4	14933	6,02
5035	0,000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	10	NDUAC_MOUSE	Q7TMF3	Ndufa12	44	258	5	17076	9,38
5041	0,046	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	20	176	3	17059	7,07
5043	0,006	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	132	3	21884	9,1
5047	0,001	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	104	3	21884	9,1
5048	0,047	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	104	3	21884	9,1

5056	0,043	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	132	3	21884	9,1
5059	0,017	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	20	176	3	17059	7,07
5080	0,000	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	20	284	4	17059	7,07
5098	0,000	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	11	HINT1_MOUSE	P70349	Hint1	18	121	2	13768	6,36
5099	0,000	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	13	ACO13_MOUSE	Q9CQR4	Acot13	16	130	2	15173	8,95
5132	0,034	Hemoglobin subunit beta-1	7	HBB1_MOUSE	P02088	Hbb-b1	51	588	7	15830	7,12
5133	0,009	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	7	NDUC2_MOUSE	Q9CQ54	Ndufc2	18	158	6	14154	9,24
5141	0,028	Hemoglobin subunit beta-1	7	HBB1_MOUSE	P02088	Hbb-b1	51	588	7	15830	7,12
5216	0,000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	6	NDUA4_MOUSE	Q62425	Ndufa4	39	223	4	9321	9,52

Tabelle 30: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von der Induktion (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$)

Spot-ID	p-Wert	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pl
---------	--------	--------------	-----	---------------------	---------------	----------	-----------------------	-------------	-------------------	-------	----

7326	0,036	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7826	0,034	Tubulin beta-2C chain	2	TBB2C_MOUSE	P68372	Tubb2c	18	501	6	49799	4,79
4286	0,008	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	9	KPYM_MOUSE	P52480	Pkm2	11	643	8	57850	7,18
4441	0,031	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
4571	0,002	LIM domain-binding protein 3	14	LDB3_MOUSE	Q9JKS4	Ldb3	16	247	4	76383	7,96
4580	0,017	Succinyl-CoA ligase [GDP- forming] subunit alpha, mitochondrial	6	SUCA_MOUSE	Q9WUM5	Suclg1	9	148	3	34972	9,46
4614	0,005	Myozenin-2	3	MYOZ2_MOUSE	Q9JJW5	Myoz2	15	116	2	29743	8,53
4634	0,012	Myozenin-2	3	MYOZ2_MOUSE	Q9JJW5	Myoz2	15	116	2	29743	8,53
4756	0,015	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial	13	AUHM_MOUSE	Q9JLZ3	Auh	14	84	2	33374	9,57
4928	0,040	Alpha-crystallin B chain	9	CRYAB_MOUSE	P23927	Cryab	16	430	8	20056	6,76
4998	0,038	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial	14	PPIF_MOUSE	Q99KR7	Ppif	9	100	3	21723	9,32
5015	0,045	Heat shock protein beta-7	4	HSPB7_MOUSE	P35385	Hspb7	24	214	3	18610	5,84

Tabelle 31: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Geschlecht und Stamm (mehrfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$)

Spot-ID	p-Wert	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pI
7346	0,018	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
7373	0,016	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1243	20	223426	5,57
7421	0,023	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	1036	15	223426	5,57
7437	0,010	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	617	8	223426	5,57
7438	0,006	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	5	710	9	223426	5,57
7508	0,029	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	54	223426	5,57
7521	0,032	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
7531	0,040	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	9	791	16	223426	5,57
7539	0,006	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	54	223426	5,57
7569	0,029	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	16	TRAP1_MOUSE	Q9CQN1	Trap1	9	296	6	80159	6,25
7641	0,011	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K	13	HNRPK_MOUSE	P61979	Hnrnpk	8	88	4	50944	5,39

7763	0,032	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	12	219	4	60917	5,91
7786	0,000	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	3	175	2	60917	5,91
7826	0,034	Tubulin beta-2C chain	2	TBB2C_MOUSE	P68372	Tubb2c	18	501	6	49799	4,79
7894	0,029	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	10	ATPB_MOUSE	P56480	Atp5b	58	1694	30	56265	5,19
7929	0,019	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	10	ATPB_MOUSE	P56480	Atp5b	58	1694	30	56265	5,19
7966	0,024	Protein NDRG2	14	NDRG2_MOUSE	Q9QYG0	Ndrp2	6	101	2	40763	5,23
7977	0,001	Protein NDRG2	14	NDRG2_MOUSE	Q9QYG0	Ndrp2	6	101	2	40763	5,23
8062	0,017	Troponin T	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8077	0,040	Apolipoprotein A-IV	9	APOA4_MOUSE	P06728	Apoa4	10	70	3	45001	5,41
8188	0,013	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8196	0,024	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	14	ODPB_MOUSE	Q9D051	Pdhp	22	367	7	38912	6,41
8204	0,000	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	68	1606	27	32661	4,69

8209	0,002	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8221	0,041	Tropomyosin alpha-1 chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	68	1606	27	32661	4,69
8354	0,032	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	14	ODPB_MOUSE	Q9D051	Pdhb	22	367	7	38912	6,41
8374	0,012	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, mitochondrial	5	COQ5_MOUSE	Q9CX10	Coq5	6	101	3	37312	7,14
8434	0,035	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, mitochondrial	5	COQ5_MOUSE	Q9CX10	Coq5	6	101	3	37312	7,14
8532	0,000	Myosin light chain 3	9	MYL3_MOUSE	P09542	Myl3	29	252	5	18852	4,86
8534	0,015	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	19	PRDX3_MOUSE	P20108	Prdx3	21	293	5	28109	7,15
8537	0,023	Myosin light chain 3	9	MYL3_MOUSE	P09542	Myl3	29	252	5	18852	4,86
8583	0,015	Protein DJ-1	4	PARK7_MOUSE	Q99LX0	Park7	6	170	5	20008	6,32
8603	0,037	ATP synthase subunit d, mitochondrial	11	ATP5H_MOUSE	Q9DCX2	Atp5h	13	161	4	18738	5,52
8606	0,008	Apolipoprotein A-I	9	APOA1_MOUSE	Q00623	Apoa1	21	471	5	30569	5,64

8682	0,048	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86
8695	0,000	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	5	MLRV_MOUSE	P51667	Myl2	29	252	5	18852	4,86
8814	0,040	Transcription elongation factor B polypeptide 2	17	ELOB_MOUSEP62869ETceb2	P62869	Tceb2	18	149	2	13162	4,87
4340	0,009	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	18	ATPA_MOUSE	Q03265	Atp5a1	29	959	12	59716	9,22
4402	0,028	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	11	ACOX1_MOUSE	Q9R0H0	Acox1	3	164	2	74587	8,64
4411	0,010	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	5	ECHB_MOUSE	Q99JY0	Hadhb	40	1100	25	51353	9,43
4446	0,021	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
4473	0,041	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2	IVD_MOUSE	Q9JHI5	Ivd	7	137	12	46296	8,53
4521	0,025	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	9	THIL_MOUSE	Q8QZT1	Acat1	45	1116	19	44787	8,71
4538	0,015	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	5	ACADS_MOUSE	Q07417	Acads	3	41	2	44918	8,96

4571	0,019	LIM domain-binding protein 3	14	LDB3_MOUSE	Q9JKS4	Ldb3	16	247	4	76383	7,96
4574	0,013	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	4	GRHPR_MOUSE	Q91Z53	Grhpr	6	88	2	35306	6,0
4579	0,020	Reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial	10	RT4I1_MOUSE	Q924D0	Rtn4ip1	26	539	8	43344	9,29
4583	0,048	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	G3P_MOUSE	P16858	Gapdh	8	232	2	35787	8,44
4589	0,000	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	G3P_MOUSE	P16858	Gapdh	17	202	8	35787	8,44
4592	0,009	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	G3P_MOUSE	P16858	Gapdh	20	355	5	35787	8,44
4620	0,008	Malate dehydrogenase, mitochondrial	5	MDHM_MOUSE	P08249	Mdh2	16	511	9	35574	8,83
4645	0,003	L-lactate dehydrogenase A chain	7	LDHA_MOUSE	P06151	Ldha	32	504	10	36475	7,62
4666	0,003	Prohibitin-2	6	PHB2_MOUSE	O35129	Phb2	5	335	4	33276	9,83
4668	0,012	Myozenin-2	3	MYOZ2_MOUSE	Q9JJW5	Myoz2	15	116	2	29743	8,53
4673	0,000	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	11	VDAC1_MOUSE	Q60932	Vdac1	69	2534	16	32331	8,55

4677	0,044	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	3	HCDH_MOUSE	Q61425	Hadh	6	98	3	34442	8,76
4683	0,008	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
4687	0,006	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	16	BDH_MOUSE	Q80XN0	Bdh1	9	79	4	38260	9,14
4697	0,001	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	3	HCDH_MOUSE	Q61425	Hadh	6	92	3	34442	8,76
4709	0,040	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdlim5	6	142	3	63289	8,61
4740	0,013	Phosphoglycerate mutase 1	19	PGAM1_MOUSE	Q9DBJ1	Pgam1	3	140	2	28814	6,67
4750	0,002	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	48	661	14	24244	9,57
4751	0,000	Troponin I, cardiac muscle	7	TNNI3_MOUSE	P48787	Tnni3	48	661	14	24244	9,57
4772	0,001	Calcyclin-binding protein	1	CYBP_MOUSE	Q9CXW3	Cacybp	8	88	2	26494	7,63
4787	0,000	Electron transfer flavoprotein subunit beta	7	ETFB_MOUSE	Q9DCW4	Etfb	22	375	5	27606	8,24
4835	0,004	Triosephosphate isomerase	6	TPIS_MOUSE	P17751	Tpi1	22	389	6	26696	6,9
4842	0,004	Triosephosphate isomerase	6	TPIS_MOUSE	P17751	Tpi1	22	389	6	26696	6,9
4847	0,029	Protein-L-isoaspartate(D-spartate)	10	PIMT_MOUSE	P23506	Pcmt1	16	225	4	24619	7,1

		O-methyltransferase									
4848	0,003	ES1 protein homolog, mitochondrial	10	ES1_MOUSE	Q9D172	D10Jhu81 e	6	84	2	28073	9,00
5004	0,009	Cofilin-1	19	COF1_MOUSE	P18760	Cfl1	10	83	2	18548	8,22
5010	0,000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	13	NDUS4_MOUSE	Q9CXZ1	Ndufs4	11	65	2	19772	10,0
5035	0,000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	10	NDUAC_MOUSE	Q7TMF3	Ndufa12	44	258	5	17076	9,38
5040	0,004	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	20	284	4	17059	7,07
5080	0,000	Myoglobin	15	MYG_MOUSE	P04247	Mb	20	284	4	17059	7,07
5098	0,000	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	11	HINT1_MOUSE	P70349	Hint1	18	121	2	13768	6,36
5132	0,018	Hemoglobin subunit beta-1	7	HBB1_MOUSE	P02088	Hbb-b1	51	588	7	15830	7,12
5141	0,000	Hemoglobin subunit beta-1	7	HBB1_MOUSE	P02088	Hbb-b1	51	588	7	15830	7,12
5149	0,006	Hemoglobin subunit alpha	11	HBA_MOUSE	P01942	Hba	24	148	3	15076	7,96
5197	0,022	Cytochrome c oxidase subunit	7	CX6B1_MOUSE	P56391	Cox6b1	30	70	2	10065	8,96

		6B1									
5216	0,004	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	6	NDUA4_MOUSE	Q62425	Ndufa4	39	223	4	4321	9,52

Tabelle 32: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Geschlecht und TAC (mehrfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$)

Spot-ID	p-Wert	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen- name	Sequenz- abdek- kung (%)	Mowse Score	gematcht e Peptide	Masse	pI
7495	0,030	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	477	6	223426	5,57
7505	0,006	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7507	0,016	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	1	119	0	223426	5,57
7533	0,002	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	4	617	8	223426	5,57
7534	0,027	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7539	0,006	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	17	1963	54	223426	5,57
7769	0,049	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	10	128	5	45969	5,24
7777	0,022	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	13	320	6	45969	5,24

7779	0,038	Alpha-1-antitrypsin 1-5	12	A1AT5_MOUSE	Q00898	Serpina1e	16	423	8	45862	5,44
7826	0,006	Tubulin beta-2C chain	2	TBB2C_MOUSE	P68372	Tubb2c	18	501	6	49799	4,79
7836	0,006	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00898	Serpina1d	10	128	5	45969	5,24
8181	0,000	Tropomyosin-1 alpha chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8188	0,023	Tropomyosin-1 alpha chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	68	1606	27	32661	4,69
8202	0,038	Tropomyosin-1 alpha chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8204	0,008	Tropomyosin-1 alpha chain	9	TPM1_MOUSE	P58771	Tpm1	11	83	3	32661	4,69
8827	0,023	Galectin-1	15	LEG1_MOUSE	P16045	Lgals1	5	90	3	14856	5,32
4170	0,019	Trifunctional enzyme subunit alpha	5	ECHA_MOUSE	Q8BMS1	Hadha	26	1071	21	52617	9,24
4441	0,035	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
4446	0,048	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	18	THIM_MOUSE	Q8BWT1	Acaa2	16	501	7	41831	8,33
4535	0,034	Phosphoglycerate kinase 1	X	PGK1_MOUSE	P09411	Pgk1	11	307	6	44508	8,02
5099	0,021	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	13	ACO13_MOUSE	Q9CQR4	Acot13	16	130	2	15173	8,95

Tabelle 33: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Stamm und TAC (mehrfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$)

Spot-ID	p-Wert	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pI
7763	0,036	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	11	CH60_MOUSE	P63038	Hspd1	12	219	4	60917	5,91
7792	0,040	Vimentin	2	VIME_MOUSE	P20152	Vim	24	568	10	35655	5,06
4805	0,041	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	4	DHSB_MOUSE	Q9CQA3	Sdhb	15	201	4	31793	8,96
4932	0,040	Alpha-crystallin B chain	9	CRYAB_MOUSE	P23927	Cryab	23	430	8	20056	6,76
5047	0,014	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	104	3	21884	9,1
5048	0,031	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	104	3	21884	9,1
5056	0,011	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	132	3	21884	9,1
5141	0,024	Hemoglobin subunit beta-1	7	HBB1_MOUSE	P02088	Hbb-b1	51	588	7	15830	7,12
5197	0,022	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	7	CX6B1_MOUSE	P56391	Cox6b1	30	70	2	10065	8,96

Tabelle 34: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Geschlecht, Stamm und TAC (mehrfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$)

Spot-ID	p-Wert	Protein-name	Chr	SwissProt Accession	Swiss Prot ID	Gen-name	Sequenz-abdeckung (%)	Mowse Score	gematchte Peptide	Masse	pI
7326	0,043	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	3	164	5	223426	5,57
7373	0,049	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	10	1243	20	223426	5,57
7421	0,011	Myosin-6	14	MYH6_MOUSE	Q02566	Myh6	8	1036	15	223426	5,57
7836	0,032	Alpha-1-antitrypsin 1-4	12	A1AT4_MOUSE	Q00897	Serpina1d	10	128	5	45969	5,24
8061	0,032	Troponin T, cardiac muscle (TnTc)	1	TNNT2_MOUSE	P50752	Tnnt2	22	318	8	35804	4,98
8391	0,040	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	8	COQ9_MOUSE	Q8K1Z0	Coq9	7	100	2	35061	5,6
8487	0,032	6-phosphogluconolactonase	8	6PGL_MOUSE	Q9CQ60	Pgls	16	113	2	27237	5,55
4191	0,044	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha	3	MCCA_MOUSE	Q99MR8	Mccc1	5	86	2	79293	7,7
4715	0,044	PDZ and LIM domain protein 5	3	PDLI5_MOUSE	Q8CI51	Pdlim5	6	142	3	63289	8,61
4816	0,021	Glutathione S-transferase Mu 1	3	GSTM1_MOUSE	P10649	Gstm1	27	536	7	25953	7,71

5043	0,029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	132	3	21884	9,1
5047	0,011	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	104	3	21884	9,1
5048	0,033	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	104	3	21884	9,1
5056	0,023	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	19	PRDX5_MOUSE	P99029	Prdx5	10	132	3	21884	9,1

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Mortalitätsrate der westlichen Industrieländer..	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hypertrophieformen.	2
Abbildung 3: Genetische Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz.....	4
Abbildung 4: Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) (in %) bei Männern und Frauen.....	7
Abbildung 5: einzelne Organisationsebenen des quergestreiften Muskels.....	8
Abbildung 6: Kardialer Metabolismus.	12
Abbildung 7: Entstehung konsumischer Mauslinien.	16
Abbildung 8: Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	28
Abbildung 9: Auswertung mit Delta2D (Decodon).	32
Abbildung 10: Geräteprinzip eines Maldi-TOF/TOF.....	36
Abbildung 11: Zeitstrahl des Studiendesigns.....	40
Abbildung 12: Schematische Darstellung der echokardiographischen Messung..	41
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der echokardiographischen Aufnahme im M-Mode	42
Abbildung 14: Schematische Darstellung der transversalen Aortenkonstriktion.....	43
Abbildung 15: Durchführung einer TAC-Operation.	44
Abbildung 16: Studienverlauf.....	46
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung eines 2-DE Proteinmusters eines Maus-Herzens.	47
Abbildung 18: Darstellung des linksventrikulärem Innendiameter, der Ejektionsfraktion und der LVM/KG in männlichen (dunkelgrau) und weiblichen (hellgrau) parentalen Stämmen...	49
Abbildung 19: Anzahl signifikant ($p < 0,05$) veränderter Proteinspots in den männlichen (links) und weiblichen (rechts) parentalen Stämmen im Vergleich zu B6.....	50
Abbildung 20: Anzahl aller geschlechts-spezifischer signifikant alterierender Proteinspots.	51

Abbildung 21: Darstellung aller signifikant ($p < 0,05$) veränderter Proteinspots aufgeteilt in den einzelnen konsumischen Mauslinien.	54
Abbildung 22: Hoch- und Runterregulation in männlichen und weiblichen konsumischen Stämmen.....	55
Abbildung 23: Myh6-Gruppe im Proteinmuster.....	57
Abbildung 24: Darstellung des Geschlechtervergleichs im Proteinmuster.	57
Abbildung 25: Darstellung des Proteins Alpha-1-antitrypsin mit deren Isoformen.....	59
Abbildung 26: Darstellung der Western Blot-Ergebnissen von ausgewählten männlichen und weiblichen konsumischen Stämmen.....	59
Abbildung 27: Darstellung der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in männlichen (A) und weiblichen (B) konsumischen Stämmen.	60
Abbildung 28: Korrelation der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in männlichen konsumischen Stämmen.....	62
Abbildung 29: Korrelation der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in weiblichen konsumischen Stämmen.....	63
Abbildung 30: Korrelation der Gene/Chr., SNPs/Chr. und varianten Proteine in männlichen konsumischen Stämmen ohne CS14.....	64
Abbildung 31: Darstellung der prozentualen Werte der varianten mRNAs in den männlichen konsumischen Linien.	65
Abbildung 32: Korrelation der Gene/Chr., SNPs, mRNA (cis) und mRNA (trans) in männlichen Tieren.	66
Abbildung 33: Darstellung der Streudiagramme der mRNA und Proteine in männlichen konsumischen Stämmen.....	67
Abbildung 34: Darstellung der LVM/TL (in mg/mm) nach 9 Wochen TAC-Induktion.....	71
Abbildung 35: Darstellung der EF in %, 9 Wochen nach Induktion der Hypertrophie in männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen.....	72
Abbildung 36: zeitlicher Verlauf der EF in % in männlichen (A) und weiblichen (B) Mäusen.	73

Abbildung 37: Darstellung der relativen Wanddicke (Th/r) nach 9 Wochen transversaler Aortenkonstriktion (TAC).....	74
Abbildung 38: Darstellung der signifikant ($p < 0,05$) veränderten Proteine im Krankheitsmodell.	74
Abbildung 39: Darstellung der geschlechtsspezifischen Unterschiede im Phänotyp am Beispiel von drei Merkmalen.....	81
Abbildung 40: Darstellung der Blutglucosekonzentration in verschiedenen CS.	82
Abbildung 41: Exemplarische Darstellung der unterschiedlichen Expressionen von Proteinen bei Männchen und Weibchen.	88

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Geräte und Zubehör	18
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	19
Tabelle 3: Chemikalien	20
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	22
Tabelle 5: OP- Zubehör	24
Tabelle 6: Probenaufarbeitung.....	26
Tabelle 7: IEF-Lauf	29
Tabelle 8: Studiendesign	40
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung des Körpergewichtes (KG), der Herzrate (HR), der Vorderwände (IVSs und IVSd), der Hinterwände (LVPWs und LVPWd) und dem Differentialkoeffizienten (Th/r) in den parentalen Stämmen männlicher und weiblicher Mäuse.	48
Tabelle 10: Proteine mit stammspezifischen Proteinveränderungen.....	52
Tabelle 11: Proteine mit geschlechtsspezifischen Proteinveränderungen.....	53
Tabelle 12: Vergleich der konsumischen Mauslinien (CS) mit den Kontrolltieren B6, nach Geschlecht getrennt.....	56
Tabelle 13: Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere, nach den einzelnen konsumischen Linien getrennt.	58
Tabelle 14: Tabellarische Darstellung des Körpergewichtes (KG), der Herzrate (HR), der Vorderwände (IVSs und IVSd), der Hinterwände (LVPWs und LVPWd), des intraventrikulären Diameter (LVIDs und LVIDd), der linken Ventrikelmasse in Bezug auf das Körpergewicht (LVM/KG), der Ejektionsfraktion (EF) und dem Differentialkoeffizienten (Th/r) in CS14 männlicher und weiblicher Mäuse.....	69
Tabelle 15: Übersicht der Körpergewichte und Herzgewichte nach 9 Wochen.	70
Tabelle 16: Klassifizierung der Proteine in funktionelle Kategorien mittels einfaktorieller ANOVA.	75

Tabelle 17: Klassifizierung der Proteine in funktionelle Kategorien mittels multifaktorieller ANOVA.	76
Tabelle 18: Echokardiographische Daten der parentalen unbehandelten Gruppen, männlich 11 Wochen alt.....	I
Tabelle 19: Echokardiographische Daten der parentalen unbehandelten Gruppen, weiblich 11 Wochen alt.....	I
Tabelle 20: Identifizierungsinformationen zu den bei den männlichen parentalen Stämmen versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen.....	II
Tabelle 21: Identifizierungsinformationen zu den bei den männlichen F1 versus PWD unterschiedlich exprimierten Proteinen.....	VII
Tabelle 22: Identifizierungsinformationen zu den bei den weiblichen parentalen Stämme versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen.....	IX
Tabelle 23: Identifizierungsinformationen zu den bei den weiblichen F1 versus PWD unterschiedlich exprimierten Proteinen.....	XIII
Tabelle 24: Identifizierungsinformationen zu den bei den männlichen CS versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen.....	XVI
Tabelle 25: Identifizierungsinformationen zu den bei den weiblichen CS versus B6 unterschiedlich exprimierten Proteinen.....	XXIX
Tabelle 26: Echokardiographische Daten der männlichen Tiere, 9 Wochen nach TAC bzw. Sham.....	XXXVI
Tabelle 27: Echokardiographische Daten der weiblichen Tiere, 9 Wochen nach TAC bzw. Sham.....	XXXVII
Tabelle 28: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig vom Geschlecht	XXXVII
Tabelle 29: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig vom Stamm.....	XLVI
Tabelle 30: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von der Induktion	LV

Tabelle 31: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Geschlecht und Stamm.....	LVII
Tabelle 32: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Geschlecht und TAC	LXIV
Tabelle 33: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Stamm und TAC.....	LXVI
Tabelle 34: Identifizierungsinformationen zu den bei den TAC versus Sham unterschiedlich exprimierten Proteinen abhängig von Geschlecht, Stamm und TAC.....	LXVII

PUBLIKATIONEN

Forler S, Witt H, Klein O, Grimm C, Diedrich M, Yaspo ML, Klose J. *Protein and RNA expression in consomic mouse strains: proteome-wide and sex-specific variation of heart proteins*. In prep.

Forler S, Klein O, Fliegner D, Grimm C, Regitz-Zagrosek V, Klose J. *Proteome analysis in consomic mouse strains exposed to myocard hypertrophy: Disease associated modifier effects in males and females*. In prep.

KONGRESSBEITRÄGE – POSTER UND VORTRÄGE

S Forler, O Klein, Y Kläre, J Klose. *Polymorphisms lead to sex-specific expression of heart proteins. Investigation of consomic mouse strains*. Posterbeitrag, 4th Congress, International Society of Gender in Medicine (IGM).

J Klose, S Forler, O Klein. *Males and Females and the Complexity of the Proteome*. HUPO 2011, 10th world congress, Genf, Schweiz.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Stefanie Forler, die vorliegende Arbeit selbstständig erfasst und nur die Hilfsmittel unter den angegebenen Quellen verwendet habe.

Berlin, den