

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Proteom-Analyse des Mausherzens
Untersuchungen zum Einfluss des Alters, des Geschlechts,
der Diät und unter Berücksichtigung hormoneller
Manipulationen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karima Schwab

aus Tunis

Gutachter: 1. Prof. Dr. Franz Theuring
2. Prof. Dr. Roza Maria Kamp
3. Prof. Dr. Michael Linscheid

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	2
3 Methodik	3
4 Ergebnisse	4
4.1 Publikation 1: Dietary phytoestrogen supplementation induces sex differences in the myocardial protein pattern of mice: A comparative proteomics study 4	
4.2 Publikation 2: Adaptation of proteomic techniques for the identification and characterization of protein species from murine heart.....	5
4.3 Publikation 3: Endothelin-1 overexpression restores diastolic function in eNOS knockout mice.....	6
5 Diskussion.....	7
5.1 Publikationen 1 und 2: Proteom-Analyse im Herzen der Maus nach Manipulation von Geschlechtshormonen	7
5.2 Publikation 3: Proteom-Analyse im Herzen der Maus nach genetischer Manipulation von Blutdruck-regulierenden Hormonen und Enzymen.....	9
6 Ausblick.....	10
7 Literaturverzeichnis.....	11
Anteilerklärung.....	15
Publikationsliste	17
Selbständigkeitserklärung	21
Danksagung	22

Abstract

Sowohl das erhöhte kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko bei postmenopausalen Frauen als auch das Auftreten von diastolischer Dysfunktion, kardialer Fibrose und Hypertrophie im Östrogen-freien Tiermodell deuten auf die kardioprotektive Rolle von Östrogenen hin. Große randomisierte Human-Studien mit synthetischem Östrogen-Ersatz lieferten jedoch widersprüchliche Resultate und trieben die Suche nach alternativen Therapien voran. Phyto-Östrogene sind pflanzliche Hormone, welche agonistische Aktivitäten zu den Östrogen-Rezeptoren aufweisen und alternative Substanzklassen zu synthetischen Östrogenen darstellen könnten.

In zwei Studien der vorliegenden Arbeit wurde der geschlechtsspezifische Einfluss des Phyto-Östrogen Genistein auf das kardiale Proteinmuster in der Maus als Tiermodell untersucht. Durch Genistein konnte im adulten Herzen eine Erhöhung von Fettsäure-abbauenden Enzymen und von Proteinen zur Energiegewinnung festgestellt werden. Die somit erhöhte Energiegewinnung könnte ein Hinweis auf die protektive Wirkung von Genistein darstellen. Des Weiteren konnte ausschließlich bei weiblichen Tieren eine erhöhte Menge an phosphorylierter regulatorischer Myosin-Leichtkette-2 durch Kastration beobachtet werden, welche durch Genistein verstärkt wurde. Diese Hochregulation könnte möglicherweise adaptatorisch sein, da eine herabgesetzte Myosin-Phosphorylierung mit verminderter Myokardfunktion in Zusammenhang gebracht wird.

In einer weiteren Studie konnte die protektive Wirkung von Endothelin in einem NO-Knockout Tiermodell gezeigt werden. Diese Protektion beruht möglicherweise auf der Unterbindung der zytoskelettalen Disassemblierung, hervorgebracht durch veränderte Abundanz von Cofilin und Destrin. Weiterhin könnte die Verschiebung des Stoffwechsels von der Beta-Oxidation hin zur Glykolyse und die Verbesserung der oxidativen Umgebung zur protektiven Wirkung von Endothelin beigetragen haben.

1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die am weitesten verbreitete Krankheitsgruppe mit Todesfolge dar [1,2]. Große epidemiologische Studien zeigen, dass Frauen durchschnittlich 10 bis 15 Jahre später als Männer kardiovaskuläre Erkrankungen entwickeln, jedoch steigt das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko bei postmenopausalen Frauen exponentiell an [3]. Weiterhin zeigen epidemiologische Studien, dass bezüglich der Gewichtung einzelner Risikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Pathologien deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern bestehen [4-7]. Dies deutet auf einen kardioprotektiven Effekt weiblicher Sexualhormone hin, obgleich genaue Wirkungsmechanismen nicht ausreichend untersucht wurden [8]. Die potenzielle Bedeutung Sexualhormon-vermittelter Effekte auf die Entwicklung kardiovaskulärer Pathologien wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass sich Expressionsunterschiede der Östrogen-Rezeptoren alpha und beta im Rahmen atherosklerotischer Veränderungen und der ventrikulären Hypertrophie nachweisen lassen [9-11]. Obgleich mit dem Nachweis einer Verbindung zwischen Östrogen-abhängigen Signaltransduktionsprozessen und der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 (ET-1) bzw. der Modulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf molekularer Ebene erste Hinweise auf mögliche Wirkungsmechanismen dieser Substanzen existieren [12-15], ist eine umfassende Analyse geschlechtsspezifischer molekularer Veränderungen bislang nicht erfolgt. Große randomisierte Studien zeigen jedoch, dass ein Modell, in dem weibliche Sexualhormone pauschal eine kardioprotektive Rolle spielen, für eine Übertragung in die klinische Praxis zu vereinfacht ist [16]. So fand sich in der Women's Health Initiative Studie nicht nur ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Mamma- bzw. Endometriumskarzinomen unter einer postmenopausalen Hormonersatztherapie; auch der vermutete kardioprotektive Effekt einer Hormonsubstitution ließ sich in dieser großen randomisierten Studie nicht bestätigen [17]. Eine Reihe von Beobachtungen deutet darauf hin, dass Unterschiede zwischen synthetischen und natürlich vorkommenden Steroiden für diese Diskrepanzen verantwortlich sein könnten [18]. Phyto-Östrogene wie Genistein und Daidzein, die zum Beispiel in großem Maße in Soja vorkommen und mit den Östrogen-Rezeptoren alpha und beta interagieren, könnten hier eine mögliche Alternative darstellen [19,20]. So werden diesen Verbindungen verschiedene kardioprotektive Effekte

inklusive einer Verbesserung des Lipidprofils sowie einer direkten Wirkung auf die Proliferation und Migration glattmuskulärer Zellen im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose zugeschrieben [21-25]. Parallel zeigte sich in zahlreichen Untersuchungen ebenfalls eine günstige Wirkung von Soja auf die Reduktion vieler menopausaler Symptome [26]. Zusammenfassend konnten damit sowohl in epidemiologischen als auch in tierexperimentellen Studien überzeugende Hinweise auf eine wesentliche Bedeutung geschlechtsspezifischer Faktoren für die Physiologie und Pathophysiologie des kardiovaskulären Systems gezeigt werden. Es erscheint daher plausibel, dass pharmakologische Therapiestrategien, die diese Unterschiede berücksichtigen, zu einer verbesserten Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen und Risikofaktoren beitragen könnten. Die Erfahrungen mit der postmenopausalen Hormonersatztherapie zeigen jedoch ebenfalls, dass unser derzeitiges Verständnis geschlechtsspezifischer Komponenten der kardiovaskulären Pathophysiologie unvollständig und eine direkte Übertragung grundlagenwissenschaftlicher Erkenntnisse in die klinische Praxis noch nicht erlaubt ist. In den vorliegenden Studien sollen durch Anwendung moderner Verfahren der Proteinbiochemie neue Erkenntnisse über die Bedeutung geschlechtsspezifischer Faktoren für die Physiologie des kardiovaskulären Systems liefern und somit perspektivisch zu einer Verringerung dieser Diskrepanz beitragen.

2 Zielsetzung

Ziel des Promotionsvorhabens war es, den Einfluss der Faktoren Geschlecht und Alter auf die Zusammensetzung des kardialen Proteoms in einem Tiermodell zu untersuchen. Darüber hinaus wurde gezielt der Einfluss männlicher und weiblicher Geschlechtshormone sowie der Einfluss von Phyto-Östrogenen analysiert, um molekulare Korrelate der eingangs beschriebenen Unterschiede in der klinischen Wirkung dieser Stoffgruppen zu identifizieren. Als Modell dienten sowohl Wildtyp-Mäuse als auch genetisch manipulierte Tiere, in denen wichtige Regulatoren des Blutdrucks (ET-1 und NO-Synthasen) modifiziert wurden. Mittels einer Kombination aus hochauflösender zweidimensionaler Gelelektrophorese und massenspektrometrischen Technologien sollten hierzu zunächst Proteine identifiziert werden, die einer alters-, geschlechts- oder hormonspezifischen Regulation unterlagen bzw. in ihrer Expression durch Phyto-Östrogene verändert wurden.

3 Methodik

Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit den genehmigten Tierversuchsanträgen (G 0050/07).

Die Darstellung des kardialen Proteoms der Versuchstiere erfolgte mit Hilfe der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE). Nach Visualisierung des Proteinmusters konnten so mehr als 1200 verschiedene Proteinspots aus dem Gesamtextrakt des Mausherzens gleichzeitig betrachtet werden. Die Identifizierung differenziell regulierter Proteine bzw. Proteinspots erfolgte im Anschluss mit Hilfe einer spezialisierten Software (Proteomweaver). Schließlich erfolgte die Identifizierung dieser Proteinspots durch die NanoLC Electrospray Ionisation Ion Trap Mass Spectrometry (NanoLC-ESI-MS/MS). Um biologisch relevante Netzwerke zu identifizieren, wurden die unterschiedlich abundanten Proteine in Netzwerke organisiert und relevante Schlüsselproteine wurden weiterhin auf Protein- und/oder RNA-Ebene validiert. Posttranslationale Modifikationen spielen in zellulären Prozessen eine bedeutende Rolle. Während Genomics-Analysen Genprodukte nur quantifizieren können, bieten Proteomics-Analysen die Charakterisierung ihrer aktiven Produkte auf Proteinspeziesebene. Eine Proteinspezies beschreibt nicht nur eine Splicing-Variante, sondern beinhaltet alle posttranslationalen Modifikationen eines Proteins wie z. B. Phosphorylierung, Acetylierung oder Proteinspaltung. Ausgewählte Proteine wurden mittels Linear Ion Trap Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (LITQ-FT-ICR-MS/MS) auf solche posttranslationale Modifikationen untersucht. Des Weiteren wurden histologische und immunhistochemische Techniken eingesetzt, um pathologische Veränderungen im Herz- und Aorta-Gewebe zu analysieren. Alle eingesetzten Methoden sind in den beigefügten Publikationen detailliert beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Publikation 1: Dietary phytoestrogen supplementation induces sex differences in the myocardial protein pattern of mice: A comparative proteomics study

In dieser Studie wurde der Einfluss von Genistein, einem pflanzlichen Hormon mit Affinität zu beiden Östrogen-Rezeptoren, auf das kardiale Proteinmuster sowohl intakter als auch kastrierter männlicher und weiblicher Tiere untersucht. Durch Genistein-Zugabe konnte bei intakten männlichen Tieren eine Erhöhung sowohl des Herz- als auch des Körpergewichts beobachtet werden. Dieser Effekt konnte bei kastrierten Tieren nicht beobachtet werden. Des Weiteren wiesen adulte männliche Tiere verglichen mit intakten weiblichen Tieren erhöhte Herz- und Körpergewichte, vergrößerte Kardiomyozyten-Durchmesser (Hinweis auf Herzhypertrophie) und fortgeschrittene Fibrose auf. Durch Kastration wurden bei männlichen Tieren sowohl der Kardiomyozyten-Durchmesser als auch der Fibrosegrad herabgesetzt, wobei dieser Effekt durch Genistein-Zugabe verstärkt wurde. Diese Ergebnisse weisen auf mögliche protektive Genistein-Effekte bei männlichen Tieren hin.

Da Genistein agonistische Aktivitäten für beide Östrogen-Rezeptoren aufweist, wurden diese auf Proteinebene quantifiziert. Bei intakten adulten Tieren bewirkte die Genistein-Behandlung eine Herabsetzung beider Rezeptoren in weiblichen Tieren, jedoch eine Erhöhung des Östrogen-Rezeptors alpha in männlichen Tieren. Diese Unterschiede wurden durch Kastration unterbunden. Die Proteom-Analyse ergab insgesamt 269 differenziell abundante Proteinspots, von denen 212 erfolgreich mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert wurden. Diese Proteinspots repräsentierten insgesamt 122 verschiedene Proteine, da ein Protein auf Grund seiner verschiedenen Spezies in mehr als einem Spot präsent sein kann.

Die prominentesten Proteinnetzwerke, welche durch die Genistein-Zugabe verändert wurden, waren filamentale Proteine des Zytoskeletts und mitochondriale Proteine, die sowohl beim Fettsäureabbau als auch bei der oxidativen Phosphorylierung und dem oxidativen Stress eine Rolle spielen. Bezüglich zytoskelettaler Proteine waren u.a. Desmin sowohl in weiblichen als auch in männlichen Tieren verschieden exprimiert. Dagegen waren LIM-domain-binding-Protein-3 und die regulatorische Myosin-Leichtkette-2 nur in weiblichen Tieren verändert. Mehrere Proteine des Fettsäureabbaus, z. B. Langketten-spezifische Acyl-CoA Dehydrogenase (ACADV),

Carnitine O-palmitoyltransferase 2 (CPT2), Fettsäure-bindendes Protein (FABPH) und Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (HCDH) waren sowohl in männlichen und auch in weiblichen Tieren verschieden reguliert. Dabei unterlagen die meisten dieser Proteine einer Hochregulation durch Genistein. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Genexpression dieser Proteine durch den Östrogen-Rezeptor alpha und/oder des Peroxisome-proliferator-activated-Receptor alpha (PPARA) reguliert wird. Beide Rezeptoren benötigen einen Aktivierungsfaktor: Peroxisome-proliferator-activated-Receptor-Gamma-Coactivator-1 alpha (PRGC1). Um eine Überexpression auf Genebene festzustellen, wurden deshalb PRGC1 und Zielproteine von PPARA analysiert. Sowohl für PRGC1 als auch für ausgewählte Zielgene von PPARA konnte eine erhöhte Expression nachgewiesen werden, die einer Genistein-Regulation unterlag. Die Ergebnisse zeigen, dass Genistein den Fettsäureabbau nicht nur auf transkriptionaler Ebene (mRNA-Analyse), sondern auch auf Proteinebene (Immunoblot-Analyse) und Proteinspeziesebene (2-DE-Analyse) beeinflusst.

4.2 Publikation 2: Adaptation of proteomic techniques for the identification and characterization of protein species from murine heart

Der Einfluss von Genistein auf posttranslationale Modifikationen vier ausgewählter Proteine wurde auf Proteinspeziesebene untersucht. Die Proteine ATP-Synthase alpha, trifunktionelles Enzym alpha, Malat-Dehydrogenase und Myosin-regulatorische-Leichtkette-2 wurden in jeweils 9, 4, 7 und 4 Proteinspots identifiziert. Der Unterschied zwischen Spezies des gleichen Proteins konnte mittels 2-DE zunächst grob anhand der Position im 2-DE-Gel beschrieben werden (veränderter isoelektrischer Punkt und veränderte Proteingröße). Im weiteren Verlauf wurden mittels massenspektrometrischer Verfahren und der Kombination verschiedener Proteasen zur Erhöhung der Proteinsequenzabdeckung Spaltprodukte und chemische Modifikationen identifiziert und beschrieben.

Für ATP-Synthase alpha wurden vier degradierte Spezies, zwei intakte unmodifizierte Spezies, zwei Spezies mit jeweils einer Acetylierung an der Aminosäure Serin 106 und eine Spezies mit drei translationalen Modifikationen (Phosphorylierungen an Serin 52 und Serin 53 und Acetylierung an Serin 106) identifiziert. Für das trifunktionelle Enzym alpha konnten zwei intakte unmodifizierte Spezies und zwei intakte, jedoch verschieden acetylierte Spezies (Lysin 255 und Lysin 415) gemessen werden. Malat-Dehydrogenase wies insgesamt drei

degradierte und vier intakte Spezies auf, wobei chemische Modifikationen nicht festgestellt werden konnten. Für Myosin-regulatorische-Leichtkette-2 wurden je eine degradierte und eine zweifach phosphorylierte Spezies (Serin 14 und Serin 15) gemessen, sowie zwei unmodifizierte intakte Spezies und eine phosphorylierte intakte Spezies (Serin 15).

4.3 Publikation 3: Endothelin-1 overexpression restores diastolic function in eNOS knockout mice

Die NO- und ET-1-Systeme regulieren den Blutdruck und sind starke Effektoren des gesamten kardiovaskulären Systems, wobei sich beide Systeme gegenseitig beeinflussen und regulieren. Dabei ist ET-1 ein starker Vasokonstriktor und NO ein Vasodilatator. Da in der Vergangenheit die Überexpression von ET-1 im Modellorganismus der Maus auf Grund einer kompensatorischen Hochregulation des NO-Systems nicht den erwarteten blutdrucksteigernden Effekt verursachte, wurden in dieser Studie sowohl das ET-1- als auch das NO-Synthase-System (NOS, u.a. endotheliale NOS oder eNOS) manipuliert. eNOS-Knockout-Tiere entwickelten im Vergleich zu ET-1 transgenen und Kontrolltieren sowohl eine Hypertonie als auch eine diastolische Dysfunktion sowie eine kardiale Hypertrophie. Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Überexpression von ET-1 in den eNOS-Knockout-Tieren unterbunden werden. Die vergleichende Analyse des kardialen Proteoms zeigte in eNOS-Knockout-Tieren eine erhöhte Abundanz von Cofilin und Destrin, welche bei der Deassemblierung von Aktin-Filamenten eine Rolle spielen. Dies konnte durch die zusätzliche Überexpression von ET-1 in den eNOS-Knockout-Tieren unterbunden werden. Ferner führte die Überexpression von ET-1 zu einer erhöhten Expression von Enzymen, die bei der Beseitigung reaktiver Sauerstoff-Species (ROS) beteiligt sind (u.a. Peroxiredoxin-6, Glutathion-S-Transferase-mu-2, und Hitzeschock-Protein-beta-7). Gleichzeitig konnte eine Verschiebung des Stoffwechsels von der Beta-Oxidation hin zur Glykolyse beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Publikationen 1 und 2: Proteom-Analyse im Herzen der Maus nach Manipulation von Geschlechtshormonen

In diesen Studien wurde der Einfluss von Genistein im Zusammenhang mit Geschlecht, Alter und gonadalen Hormonen auf das Herz-Proteinmuster untersucht, wobei in einem weiteren Schritt posttranslationale Modifikationen ausgewählter Proteine identifiziert und charakterisiert wurden. Hierbei ist die Bedeutung der 2-DE hervorzuheben, da Proteine auf Proteinspeziesebene quantifiziert werden können, wodurch alle chemischen Veränderungen eines Proteins erfasst und mit der Proteinfunktion genauer korreliert werden können.

Die Zugabe von Genistein bewirkte u.a. eine Herabsetzung des Kardiomyozyten-Durchmessers und des Fibrosegrads. Dies unterstützt eine mögliche Rolle von Phyto-Östrogenen bei der Prävention der Herz-Hypertrophie.

Sowohl auf mRNA- als auch auf Protein- und Proteinspeziesebene konnte nachgewiesen werden, dass Genistein eine Erhöhung verschiedener Enzyme und Regulatoren (u.a. PPARA und PRGC1) des Fettsäure-Metabolismus bewirkte, welche u.a. Östrogen-Rezeptor alpha aktivieren oder durch diesen aktiviert werden [27-29]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass ATP-Synthase alpha, ein wichtiges Enzym der Atmungskette, vermehrt exprimiert war. Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen für die ATP-Synthase ergaben verschiedene Acetylierungs- und Phosphorylierungsstellen (Serin 52, Serin 53 und Serin 106), die neben der erhöhten Proteinmenge ebenfalls zur gesteigerten Enzymaktivität beitragen können [30]. Während zur Energiegewinnung im gesunden Herzen der Fettsäureabbau favorisiert wird, wird der Energiebedarf im erkrankten Myokard überwiegend durch den Abbau von Glukose abgedeckt [31-34]. Die Erhöhung Fettsäure-abbauender Enzyme und Regulatoren im adulten Herzen durch Genistein und eine möglicherweise damit verbundene Erhöhung der Atmungskapazität könnte ein Hinweis auf dessen protektive Wirkung darstellen.

Interessanterweise konnte in adulten männlichen Tieren durch Genistein eine Erhöhung von Enzymen (NADH-Ubiquinone-Oxidoreduktase und Succinat-Dehydrogenase-Ubiquinone-Flavoprotein) detektiert werden, welche im Zusammenhang mit der Entstehung von ROS stehen [35,36]. Zusätzlich wiesen Enzyme mit antioxidativer Wirkung (Peroxisredoxin-3, Superoxid-Dismutase und

Hitzeschock-Protein-beta-7 [37-39]) eine herabgesetzte Abundanz auf. Eine genaue Balance zwischen oxidativer Kapazität und oxidativem Stress ist von äußerster Wichtigkeit für die mitochondriale Energetik [40,41]. Die Genistein-Substitution bewirkte möglicherweise eine Störung dieser Balance, jedoch nur in männlichen Tieren. Diese Annahme wird weiterhin dadurch untermauert, dass das Enzym Aконитат-Hydratase, welches eine protektive Rolle beim Schutz und der Stabilität mitochondrialer DNA spielt [42,43], bei männlichen Tieren durch Genistein-Zugabe erhöht vorlag.

Die Bildung intrazellulärer Energie-Einheiten, bestehend aus Mitochondrien und kontraktilen Proteinen, wie z. B. Aktin, Desmin, LIM-domain-binding-Protein-3 und Myosin, ist ein wichtiger Modulator mitochondrialer Energetik und kardiomyozytärer Kontraktion [44]. Diese Proteine waren nach Genistein-Zugabe nur bei adulten weiblichen Tieren erhöht. In diesem Zusammenhang spielt die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette-2 eine wichtige Rolle, da hierdurch die Generierung von Energie und somit die Kontraktion reguliert wird [45,46]. Dabei wird durch die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette-2 über eine Serin-Aminosäure (murines Serin 14 oder 15) das Protein negativ geladen und verursacht so das Heraustreten der Myosin-Schwerkette aus dem Myosinverband hin zum Aktin, wodurch ein Strecken des Zytoskeletts erfolgt. Dagegen führt die Dephosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette-2 zum Zusammenziehen des Zytoskeletts. Wiederholt führt dieser Vorgang zur Kardiomyozyten-Kontraktion. Eine herabgesetzte Myosin-Phosphorylierung wird in Zusammenhang mit verminderter Myokardfunktion gestellt [47,48]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette-2 bei männlichen Tieren im Vergleich zu weiblichen Tieren vorlag. Dies konnte durch Zugabe von Genistein unterbunden werden und könnte auf protektive Effekte von Genistein hinweisen. Des Weiteren konnte durch Kastration eine erhöhte Menge an phosphorylierter regulatorischer Myosin-Leichtkette-2 beobachtet werden, welche jedoch nur bei weiblichen Tieren auftrat, wobei die Genistein-Zugabe eine weitere Erhöhung bewirkte (Daten nicht veröffentlicht). Diese Hochregulation könnte möglicherweise auf eine adaptatorische Kompensation hindeuten. Weiterführende Untersuchungen zu regulatorischen Proteinen dieser Phosphorylierungsprozesse deuten auf einen Zusammenhang von Genistein und dem RhoA-Signalweg hin: Eine erhöhte Myosin-Leichtketten-Kinase-

Abundanz sowie eine verminderte Myosin-Leichketten-Phosphatase-Aktivität konnten im gleichen Tiermodell bereits festgestellt werden (Daten nicht veröffentlicht). Erste Hinweise auf verantwortliche Effektoren dieses Reaktionsweges deuten auf eine mögliche Beteiligung von RhoA und der regulatorischen Untereinheit 14A der Protein Phosphatase 1 (CPI17) hin (Daten nicht veröffentlicht).

5.2 Publikation 3: Proteom-Analyse im Herzen der Maus nach genetischer Manipulation von Blutdruck-regulierenden Hormonen und Enzymen

Bei den eNOS-Knockout-Tieren konnte eine linksventrikuläre Dysfunktion festgestellt werden, welche auf Proteinebene möglicherweise mit der erhöhten Abundanz der Proteine Destrin und Cofilin zurückzuführen ist. Sowohl Destrin als auch Cofilin stehen im Zusammenhang mit der Sarkomer-Deassemblierung und könnten somit für die reduzierte Kardiomyozyten-Kontraktion verantwortlich sein [49,50]. Dabei ist zu beachten, dass ROS die Aktivierung dieser Proteine durch ihre Dephosphorylierung erhöhen können [51]. Durch zusätzliche Expression von ET-1 im eNOS-Knockout-Hintergrund konnte die kardiale Dysfunktion unterbunden werden, wobei viele ROS-beseitigende Enzyme erhöht vorlagen. Möglicherweise besteht bei einem eNOS-Knockout-Hintergrund und einer ET-1-Überexpression ein direkter Zusammenhang zwischen ROS-Beseitigung, verringerter Aktivität von Deassemblierungsproteinen und kardialer Kontraktion bzw. Funktion. Des Weiteren konnte in den gleichen Tieren eine Verschiebung des kardialen Stoffwechsels von der Oxidation von Fettsäuren zur Oxidation von Glukose beobachtet werden. Dieser Vorgang tritt in der Regel mit zunehmendem Alter und im Krankheitsfall auf und wird als adaptatorischer Schutzmechanismus angesehen, da mit der vorliegenden Sauerstoffversorgung Glucose mehr Energie liefern kann [52,53]. Eine protektive Wirkung von ET-1 durch die Verschiebung des Stoffwechselweges ist somit möglich. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von eNOS zur Kardiomyozyten-Hypertrophie, Hypertonie und kardialen Dysfunktion, möglicherweise bedingt durch das fehlerhafte Zusammenspiel kontraktile Proteine, führte. Diese Dysfunktion konnte durch eine zusätzliche ET-1-Expression verhindert werden. ET-1 verminderte sowohl die ROS-Entstehung als auch die myofilamentale Destabilisierung und führte möglicherweise auf Grund der besseren Energieversorgung zur verbesserten kardialen Kontraktilität.

6 Ausblick

In den vorliegenden Studien konnten Einblicke in das murine kardiale Proteome gewonnen werden, wobei zahlreiche Proteine und Proteinverbände identifiziert wurden, die einer alters-, geschlechts- oder hormonellen Regulation unterlagen.

In zwei Teilstudien konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette-2 im Tiermodell möglicherweise einer u.a. Genistein-abhängigen Östrogenrezeptor-vermittelten Regulation unterliegt. In diesem Zusammenhang könnten weiterführende Zellkulturexperimente zur Aufklärung dieses Reaktionsweges beitragen. Die Überexpression eines der Östrogen-Rezeptoren und die gleichzeitige Behandlung mit Genistein oder Östradiol könnten dabei helfen, den verantwortlichen Östrogen-Rezeptor zu ermitteln. Dies könnte durch Nutzung spezifischer Agonisten vervollständigt werden. Ferner könnte die Beteiligung von Effektormolekülen wie z. B. CPI17, RhoA und Proteinkinase N durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren genauer untersucht werden.

Des Weiteren konnten durch die Überexpression von ET-1 in einem eNOS-Knockout Hintergrund Erkenntnisse gewonnen werden, welche auf eine protektive Wirkung von ET-1 hinweisen. Dies könnte nicht nur auf die bekannte antiapoptische Wirkung von ET-1 beruhen [54], sondern auch auf Grund eines angepassten Metabolismus und einer verbesserten oxidativen Umgebung stattgefunden haben. Diese Einblicke könnten für die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe zur Behandlung der Herzinsuffizienz von Bedeutung sein, da bisherige klinische Studien mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten nicht den gewünschten Erfolg gezeigt haben [55].

7 Literaturverzeichnis

- [1] Bhupathy P, Haines CD, Leinwand LA. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health (Lond Engl)* 2010; 6(1): 77-95.
- [2] Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A et al. The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res* 2003; 115(2): 325-44.
- [3] Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A et al. The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res* 2003; 115(2): 325-44.
- [4] Barrett-Connor EL, Cohn BA, Wingard DL, Edelstein SL. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *JAMA* 1991; 265(5): 627-31.
- [5] Barrett-Connor E, Ferrara A. Isolated postchallenge hyperglycemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older women and men. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1998; 21(8): 1236-9.
- [6] Lundberg V, Stegmayr B, Asplund K, Eliasson M, Huhtasaari F. Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: Population and gender perspectives. *Journal of Internal Medicine* 1997; 241(6): 485-92.
- [7] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364(9438): 937-52.
- [8] Hodis HN, Mack WJ. Atherosclerosis imaging methods: Assessing cardiovascular disease and evaluating the role of estrogen in the prevention of atherosclerosis. *American Journal of Cardiology* 2002; 89(12A): 19E-27E.
- [9] Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J et al. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation* 2004; 110(20): 3270-5.
- [10] Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P et al. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *Faseb Journal* 2006; 20(7): 926-34.
- [11] Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A et al. The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res* 2003; 115(2): 325-44.
- [12] Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 2002; 53(3): 672-7.
- [13] Gragasin FS, Xu Y, Arenas IA, Kainth N, Davidge ST. Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23(1): 38-44.
- [14] Hong HJ, Liu JC, Chan P, Juan SH, Loh SH, Lin JG, Cheng TH. 17 beta-estradiol downregulates angiotensin-II-induced endothelin-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Biomedical Science* 2004; 11(1): 27-36.
- [15] Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Levin ER. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro - Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(28): 26339-48.

- [16] Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A et al. The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res* 2003; 115(2): 325-44.
- [17] Hodis HN. Assessing benefits and risks of hormone therapy in 2008: new evidence, especially with regard to the heart. *Cleve Clin J Med* 2008; 75 Suppl 4: S3-12.
- [18] Holtorf K. The Bioidentical Hormone Debate: Are Bioidentical Hormones (Estradiol, Estriol, and Progesterone) Safer or More Efficacious than Commonly Used Synthetic Versions in Hormone Replacement Therapy? *Postgraduate Medicine* 2009; 121(1): 73-85.
- [19] Bhupathy P, Haines CD, Leinwand LA. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health (Lond Engl)* 2010; 6(1): 77-95.
- [20] Park D, Huang T, Frishman WH. Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiol Rev* 2005; 13(1): 13-7.
- [21] Anderson JW, Johnstone BM, Cooknewell ME. Metaanalysis of the Effects of Soy Protein-Intake on Serum-Lipids. *New England Journal of Medicine* 1995; 333(5): 276-82.
- [22] Azadbakht L, Kimiagar M, Mehrabi Y, Esmailzadeh A, Padyab M, Hu FB, Willett WC. Soy inclusion in the diet improves features of the metabolic syndrome: a randomized crossover study in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007; 85(3): 735-41.
- [23] Cheng SY, Shaw NS, Tsai KS, Chen CY. The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women. *Journal of Womens Health* 2004; 13(10): 1080-6.
- [24] Pan W, Ikeda K, Takebe M, Yamori Y. Genistein, daidzein and glycitein inhibit growth and DNA synthesis of aortic smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition* 2001; 131(4): 1154-8.
- [25] Welty FK, Lee KS, Lew NS, Zhou JR. Effect of soy nuts on blood pressure and lipid levels in hypertensive, prehypertensive, and normotensive postmenopausal women. *Archives of Internal Medicine* 2007; 167(10): 1060-7.
- [26] Sirtori CR, Arnoldi A, Johnson SK. Phytoestrogens: End of a tale? *Annals of Medicine* 2005; 37(6): 423-38.
- [27] Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2004; 24(20): 9079-91.
- [28] Corton JC, Brown-Borg HM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 in caloric restriction and other models of longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60(12): 1494-509.
- [29] Kodde IF, van der SJ, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 146(1): 26-39.
- [30] Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu YD, Ball H, Pei JM et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Molecular Cell* 2006; 23(4): 607-18.
- [31] Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation* 2007; 116(4): 434-48.
- [32] Meng C, Jin X, Xia L, Shen SM, Wang XL, Cai J et al. Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *J Proteome Res* 2009; 8(5): 2463-75.
- [33] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 1093-129.

- [34] Jin X, Xia L, Wang LS, Shi JZ, Zheng Y, Chen WL et al. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Proteomics* 2006; 6(6): 1948-56.
- [35] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 1093-129.
- [36] Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, Zaha VG, Ilkun O et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation* 2009; 119(9): 1272-83.
- [37] Cullingford TE, Wait R, Clerk A, Sugden PH. Effects of oxidative stress on the cardiac myocyte proteome: modifications to peroxiredoxins and small heat shock proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40(1): 157-72.
- [38] Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M et al. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2006; 113(14): 1779-86.
- [39] Kohler JJ, Cucoranu I, Fields E, Green E, He S, Hoying A et al. Transgenic mitochondrial superoxide dismutase and mitochondrially targeted catalase prevent antiretroviral-induced oxidative stress and cardiomyopathy. *Lab Invest* 2009; 89(7): 782-90.
- [40] Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, Zaha VG, Ilkun O et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation* 2009; 119(9): 1272-83.
- [41] Muoio DM, Koves TR. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32(5): 874-83.
- [42] Hunzinger C, Wozny W, Schwall GP, Poznanovic S, Stegmann W, Zengerling H et al. Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including N-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species. *J Proteome Res* 2006; 5(3): 625-33.
- [43] Shadel GS. Mitochondrial DNA, aconitase 'wraps' it up. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(6): 294-6.
- [44] Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(10): 1928-39.
- [45] de Tombe PP. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *Journal of Biomechanics* 2003; 36(5): 721-30.
- [46] White MY, Cordwell SJ, McCarron HCK, Tchen AS, Hambly BD, Jeremy RW. Modifications of myosin-regulatory light chain correlate with function of stunned myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003; 35(7): 833-40.
- [47] Casey TM, Arthur PG, Bogoyevitch MA. Proteomic analysis reveals different protein changes during endothelin-1-or leukemic inhibitory factor-induced hypertrophy of cardiomyocytes in vitro. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; 4(5): 651-61.
- [48] Walker LA, Walker JS, Ambler SK, Buttrick PM. Stage-specific changes in myofilament protein phosphorylation following myocardial infarction in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 48(6): 1180-6.
- [49] Bamberg JR, McGough A, Ono S. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends in Cell Biology* 1999; 9(9): 364-70.

- [50] Huang YS, Wang SM, Hsu KL, Tseng YZ, Wu JC. Mechanism of oleic acid-induced myofibril disassembly in rat cardiomyocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 102(3): 638-49.
- [51] Kim JS, Huang TY, Bokoch GM. Reactive Oxygen Species Regulate a Slingshot-Cofilin Activation Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 2009; 20(11): 2650-60.
- [52] Recchia FA. Role of nitric oxide in the regulation of substrate metabolism in heart failure. *Heart Fail Rev* 2002; 7(2): 141-8.
- [53] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 1093-129.
- [54] Schorlemmer A, Matter ML, Shohet RV. Cardioprotective Signaling by Endothelin. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2008; 18(7): 233-9.
- [55] Kirkby NS, Hadoke PWF, Bagnall AJ, Webb DJ. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? *British Journal of Pharmacology* 2008; 153(6): 1105-19.

8 Anteilserklärung

Karima Schwab hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Karima Schwab, Boris Neumann, Nicolas Vignon-Zellweger, Andreas Fischer, Robert Stein, Peter R. Jungblut, Christian Scheler, Franz Theuring; Dietary Phytoestrogen Supplementation induces Sex Differences in the Myocardial Protein Pattern of Mice: A Comparative Proteomics Study; Proteomics Volume 11; 2011

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Studiendesign, Durchführen der Tierversuche, Durchführen der Studienmessungen und Datenvalidierung, Datenbankanalyse, statistische Auswertung, Anfertigen der Publikationsschrift.

Publikation 2: Karima Schwab, Boris Neumann, Christian Scheler, Peter R. Jungblut, Franz Theuring; Adaptation of proteomic techniques for the identification and characterization of protein species from murine heart; Amino Acids Volume 41 (2); 2011

70 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Durchführen der Studienmessungen und Datenvalidierung, Datenbankanalyse, statistische Auswertung, Anfertigen der Publikationsschrift.

Publikation 3: Nicolas Vignon-Zellweger, Katharina Relle, Elodie Kienlen, Markus Alter, Patrick Seider, Juliya Sharkovska, Susi Heiden, Philipp Kalk, Karima Schwab, Barbara Albrecht-Küpper, Franz Theuring, Johannes-Peter Stasch, Berthold Hochoer; Endothelin-1 overexpression restores diastolic function in eNOS knockout mice; Journal of Hypertension Volume 29 (5); 2011

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Durchführen der Studienmessungen Überarbeiten der Publikationsschrift.

Karima Schwab

Prof. Dr. Franz Theuring

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen
Version der vorliegenden Arbeit nicht veröffentlicht“

Publikationsliste

Begutachtete Veröffentlichungen

J. Bader, B. Neumann, K. Schwab, M. Popovic, C. Scheler, R. Pajpai; Alpha amylase production in fed-batch cultivations of *Bacillus caldolyticus*: An interpretation of fermentation course using 2-D gel electrophoresis; *Chemical and Biochemical Engineering* Volume 20 (4); 2006

J. Bader, K. Schwab, M. Popovic, R. Pajpai, B. Neumann; Application of pH and pO₂ probes during *Bacillus caldolyticus* fermentation: an additional approach for improving a feeding strategy; *Chemical and Biochemical Engineering* Volume 21 (4); 2007

K. Schwab, J. Bader, C. Brokamp, M. K. Popovic, R. Bajpai and M. Berovic; Dual feeding strategy for the production of α -amylase by *Bacillus caldolyticus* using complex media; *New Biotechnology* Volume 26 (1/2); 2009

K. Schwab, B. Neumann, C. Scheler, PR. Jungblut, F. Theuring; Adaptation of proteomic techniques for the identification and characterization of protein species from murine heart; *Amino Acids* Volume 41 (2); 2011

N. Vignon-Zellweger, K. Relle, E. Kienlen, M. Alter, P. Seider, J. Sharkovska, S. Heiden, P. Kalk, K. Schwab, B. Albrecht-Küpper, F. Theuring, J. P. Stasch and B. Hoher; Endothelin-1 overexpression restores diastolic function in eNOS knockout mice; *Journal of Hypertension* Volume 29 (5); 2011

K. Schwab, B. Neumann, N. Vignon-Zellweger, A. Fischer, R. Stein, PR. Jungblut, C. Scheler, F. Theuring; Dietary Phytoestrogen Supplementation induces Sex Differences in the Myocardial Protein Pattern of Mice: A Comparative Proteomics Study; *Proteomics* Volume 11; 2011

Abstracts

J. Bader, B. Neumann, K. Schwab, M. Popovic, C. Scheler, R. Pajpai; α -Amylase production in fed-batch cultivations of *Bacillus caldolyticus*; Chemie Ingenieur Technik Volume 77 (8); 2005

K. Schwab, C. Brokamp, C. Weigel, M. K. Popovic; Production and characterization of a recombinant Cu-full loaded bacterial laccase; J. Biotechnology Volume 131 (Issue 2S); 2007

K. Schwab, C. Brokamp, C. Weigel, M. K. Popovic; Production and characterization of α -amylase; J. Biotechnology Volume 131 (Issue 2S); 2007

N. Vignon-Zellweger, K. Relle, J. Rahnenführer, P. Seider, E. Dowuona-Hammond, Y. Sharkovska, K. Schwab, P. Kalk, C. Scheler, F. Theuring, B. Hoher; Additional lack of eNOS promotes cardiac fibrosis in ET-1 transgenic mice; J. Hypertension Volume 26 (Supplement 1); 2008

K. Schwab, B. Neumann, N. Vignon-Zellweger, C. Scheler, F. Theuring; Sex specific proteome and phosphoproteome analysis and the effects of phytoestrogens in heart and kidney of mice; J. Hypertension Volume 26 (Supplement 1); 2008

K. Schwab, S. Weise, S. Lange, J. Altvater, N. Vignon-Zellweger, C. Scheler, F. Theuring; Differential Proteome Analyses of Female and Male C57BL/6 Heart and The Effects of Hormones and Phytohormones; Gender Medicine Volume 5 (3); 2008

K. Schwab, B. Neumann, N. Vignon-Zellweger, C. Scheler, F. Theuring; Investigations of sex, age and dietary phytoestrogen related differential proteome patterns of murine heart and kidney; IUBMB Life Volume 61 (Issue 3); 2009

F. Theuring, N. Vignon-Zellweger, K. Schwab, B. Hoher; Endothelin-1 and nitric oxide in cardiovascular disease: A proteomic approach; IUBMB Life Volume 61 (Issue 3); 2009

F. Theuring, K. Schwab; The female and the male heart: what makes the difference; International Journal of Experimental and Clinical Pathology and Drug Research Volume 25 (3); 2011

Poster

J. Bader, K. Schwab, B. Neumann, M. Popovic, C. Scheler, R. Pajpai; Preliminary investigation: interpretation of a two component feeding strategy with the help of 2D-gel electrophoresis; 12. European Congress of Biotechnology, Copenhagen, Denmark, 21-24 August 2005

J. Bader, K. Schwab, B. Neumann, M. Popovic, C. Scheler, R. Pajpai; Application of pH and pO₂ probes during *Bacillus caldolyticus* fermentation: an additional approach in improving a feeding strategy; 12. European Congress of Biotechnology, Copenhagen, Denmark, 21.-24 August 2005

K. Schwab, N. Vignon-Zellweger, B. Neumann, C. Scheler, F. Theuring; Proteome analysis of mouse heart: effects of gender, age, genetic polymorphism and hormonal manipulation in mice; International Symposium of CCR, Berlin, Deutschland, 21.-22. Oktober 2005

K. Schwab, B. Neumann, C. Brokamp, M. Popovic; Dual feeding strategy for the production of α -amylase by *Bacillus caldolyticus*; European Symposium on Biochemical Engineering Science, Salzburg, Austria, 27.-30. August 2006

K. Schwab, B. Neumann, N. Vignon-Zellweger, F. Theuring; Proteome analysis of mouse hearts: effects of sex, age, diet and genetic background; Day of Science, CCR, Berlin, Deutschland, 23. November 2006

N. Vignon-Zellweger, K. Relle, E. Kienlen, S. Heiden, F. Voss, P. Kalk, K. Schwab, B. Neumann, C. Scheler, Additional lack of eNOS promotes cardiac fibrosis in ET-1 transgenic mice; 23rd Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension, New Orleans, USA, 14 – 17 Mai 2008

N. Vignon-Zellweger, K. Relle, J. Rahnenführer, P. Seider, E. Dowuona-Hammond, Y. Sharkovska, F. Voss, K. Schwab, P. Kalk, C. Scheler, F. Theuring, B. Hoher; Additional lack of eNOS promotes cardiac fibrosis in ET-1 transgenic mice; 3rd International Congress in Gender Medicine, Stockholm, Sweden, 12.-14. September 2008

Buchbeiträge

F. Theuring, K. Schwab; Protein identification by employing proteomics; Protein Engineering, Ege University Basimevi, Izmir 2007; ISBN: 978-975-483-750-6

F. Theuring, N. Vignon-Zellweger, K. Schwab; Employing proteomics to understand cardiovascular functions and diseases; Protein Analysis, Ege University Basimevi, Izmir 2009; ISBN: 978-975-483-825-1

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Karima Schwab, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Proteom-Analyse des Mausherzens - Untersuchungen zum Einfluss des Alters, des Geschlechts, der Diät und unter Berücksichtigung hormoneller Manipulationen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 27.09.2011

Karima Schwab

Danksagung

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde am Institut für Pharmakologie der Charite Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Franz Theuring angefertigt. Ihm möchte ich für die tatkräftige Unterstützung danken, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskollegen der Arbeitsgruppe Theuring, die mich sowohl praktisch als auch durch anregende Diskussionen kontinuierlich unterstützt haben.

Ferner gilt mein Dank dem gesamten Team der Proteome Factory AG, vor allem Dr. Christian Scheler, Dr. Karola Lehmann und Dipl.-Ing. Boris Neumann, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite standen.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich einen besonderen Dank an die Nachwuchskommission der Charite Universitätsmedizin Berlin, sowie dem Hypatia Programm zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlerinnen richten.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für das Verständnis und die unendliche Geduld danken.