

# 1. Einleitung

In den 70-er Jahren des 20. Jahrhunderts erlebte die Wissenschaft der Genetik ein Aufblühen. Die Genetik entwickelte sich zu einer vielversprechenden Wissenschaft und ermöglichte die Wiedergabe von detaillierten Informationen über das Erbgut eines Organismus. Ein besseres Verständnis vieler Erkrankungen konnte erreicht werden als auch das Konzipieren neuer Forschungsansätze.

Durch das übergreifende humane Genomprojekt (HUGO), an dem eine Vielzahl von Arbeitsgruppen tätig war, gelang es im Jahre 2001 eine Zahl von ca. 30000 existierenden Genen [1, 2] zu definieren. Dieser wahrliche Fortschritt – die Entschlüsselung des Erbgutes - setzte einen progressiven Schritt in die an Ansehen gewinnende Proteomforschung.

Die Proteomforschung stellt die Aufklärung von Struktur und Funktion der Produkte der Gene – den Proteinen dar. Die Proteine präsentieren das aktive Leben einer Zelle. Die Möglichkeit, alle Proteine aufzutrennen, zu identifizieren und zu charakterisieren, ist eine große Herausforderung an die Grundlagenforschung.

In der Literatur findet man 1994 erste Formulierungen zu dem Begriff des Proteoms. Das Proteom wird definiert als der quantitative Expressionszustand aller Proteine, die im Laufe des Lebens exprimiert werden [3, 4]. Aus dieser Definition geht hervor, dass das Proteom eine zeitliche Abhängigkeit aufweist. Somit lässt sich schlussfolgern, dass zu jedem Zeitpunkt des Lebens eines zu betrachtenden Systems ein zugehöriges Proteom existiert. Darüber hinaus ist das Proteom von den auf das Proteom herrschenden Gegebenheiten, wie Alter, Geschlecht und Krankheitszustand beeinflusst.

An manchen Stellen in der Literatur findet man eine Gliederung der Proteomforschung in drei Aufgabenbereiche [5]. Zunächst wird die Auftrennung aller möglichen Proteine und ihrer posttranslationalen Modifikationen (PTM) genannt. Somit soll eine Grundlage für ein besseres Verständnis der biologischen Funktion verschiedener Zellen, Organe und Organismen geschaffen werden. PTM übernehmen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle, denn Eigenschaften eines Proteins können durch proteolytische Spaltung oder durch das Anbringen verschiedener chemischer Gruppierungen verändert

werden [6]. Auch in Krankheitszuständen können Proteine unterschiedliche Modifikationen annehmen [7, 8].

Als weiterer Bereich der Proteomforschung wird die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen und derer Netzwerke definiert [5]. Da Proteininteraktionen mit verschiedensten Partnern die Aktivität sowie die Biologie und somit die Funktion der Zelle beeinflussen ist es notwendig, diese Netzwerke auf der Ebene der Proteine zu analysieren.

Der dritte Aufgabenbereich der Proteomforschung wird als die potenzielle Anwendung der Vergleiche von Proteinexpressionsmustern bei verschiedenen Erkrankungen beschrieben [5]. Hierbei werden durch den Vergleich der Proteinmuster gesunder und erkrankter Gewebe die veränderten Proteine für die jeweilige Erkrankung charakterisiert. Dieses soll die Aufklärung von pathologischen Mechanismen sowie das Entwickeln von diagnostischen Biomarkern und Arzneimitteln für verbesserte Therapieansätze ermöglichen [9]. Die Technik zur Analyse der Zellproteine hat sich in den letzten Jahren außerordentlich weiterentwickelt. Dennoch lässt sich die Anwendung vorhandener Methoden für die Proteomforschung auf ein Geringes begrenzen.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) wird in der Literatur als zentral zum Einsatz kommende Methode der Proteomforschung beschrieben. Dieses System zur Auftrennung von Proteinen findet sich in verschiedenen Konzepten und Ausführungen wieder [10-12]. Die zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglicht eine Separation der Proteine in einer Größenordnung von ca. 10000 Proteinen. Die Proteine werden in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (durch isoelektrische Fokussierung) und in der zweiten Dimension nach ihrer relativen Molmasse aufgetrennt.

Im Laufe der Zeit wurde der Identifizierung von Proteinen mehr Bedeutung zugesprochen, so dass heute auch die massenspektrometrische Analyse [13, 14] von Proteinen und Proteinkomplexen für die Proteomforschung unabdingbar ist. Nach der Bestimmung von Molekülmassen bzw. Peptidmassen ermöglicht das Recherchieren in organisierten Datenbanken eine Erfassung der Identität und Funktion von Proteinen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Proteomforschung unumgänglich ist. Durch ihre facettenreiche Wiedergabe von ablaufenden

Prozessen ermöglicht die Proteomforschung Erkenntnisfortschritt in Bezug auf das Verständnis von Krankheitsabläufen auf zellulärer Ebene.

## **1.1 Grundlagen zur Durchführung einer Proteomanalyse am Herzen**

Das Herzmuskelproteom besteht aus allen Proteinen, die im Laufe der Zeit in diesem exprimiert werden. Die Expression der Proteine ist abhängig von der Entwicklung und wird u.a. durch das Alter und Geschlecht beeinflusst. Natürliche Gegebenheiten erfordern demnach entsprechende Überlegungen zur Durchführung einer genauen Proteomanalyse.

Zunächst findet man in der Literatur eine Angabe über eine geschätzte Zahl von 100000 existierenden Proteinen [15]. Weiterhin findet man in einem Artikel von G.C. Brown folgenden Inhalt [16]. Die Proteine nehmen einen Raumanteil von 15 - 30 % in der Zelle ein und sind auf ein bestimmtes Proteinlevel in der Zelle zur Ausübung ihrer Funktionen limitiert. Diese Proteinminimierung bedingt eine unterschiedliche Kontrollverteilung über die Signalwege verschiedener Enzyme. Eine weitere strategische Überlegung zur Durchführung einer aussagekräftigen Proteomanalyse ist, dass ein und dieselbe Erkrankung viele verschiedene Ursachen haben kann. Beispielsweise kann eine Herzerkrankung durch eine Ischämie, virale Infektion oder auch durch einen genetischen Fehler hervorgerufen werden, die alle zum gleichen Phänotyp führen [3]. Im Umkehrschluss ist festzustellen, dass ein und dieselbe Erkrankung sich in unterschiedlichen Phänotypen äußern kann [17-19]. Die Konsequenz aus der zuerst erwähnten Aussage ist, dass derselbe Phänotyp durch unterschiedliche Proteine bzw. Proteingruppen erzeugt werden kann. Praktisch könnte man durch die Wahl verschiedener Mausmodelle für ein und dieselbe Erkrankung umfassende Daten erzielen. Das bedeutet, dass für eine Erkrankung unterschiedlichster Ursachen, mehrere mögliche Proteinkompositionen und Zustände vorhanden sind.

Ein wichtiger Aspekt bei der Proteomanalyse ist der Einfluss naturgegebener Faktoren. Das bedeutet, dass kardiovaskuläre Strukturen und Funktionen durch Alter, Geschlecht sowie Entwicklung natürlich beeinflusst werden. Dieser

Einfluss kann einerseits ohne das Vorhandensein einer Erkrankung einhergehen [20, 21]. Andererseits wird die Beeinflussung von kardiovaskulären Strukturen und Funktionen durch Alter, Entwicklung und Geschlecht das alters- und geschlechtsspezifische Auftreten bestimmter Herzerkrankungen begünstigt [22]. In der Literatur werden folgende alters- bzw. geschlechtsabhängige Erkrankungen als Beispiele genannt: koronare Herzerkrankungen, Athereosklerose und Bluthochdruck, wobei letztlich eine chronische Erkrankung des Herzens resultiert. Als weiteres Beispiel sei das begünstigte Auftreten des myokardialen Herzinfarktes ab dem Alter von 65 Lebensjahren aufgeführt [23]. Darüber hinaus geht aus genannter Literaturstelle hervor [22], dass die Prävalenz für solche Erkrankungen ab dem 40. Lebensjahr zunimmt. In dieser Dekade sind Frauen häufiger betroffen als Männer. In den Dekaden des 50. und 60. Lebensjahres steigt die Prävalenz weiter an, allerdings sind Frauen und Männer gleichermaßen betroffen. Weiterhin geht hervor, dass in der Dekade des 70. Lebensjahres eine steigende Prävalenz mit Bevorzugung der Männer auffällig ist. Im Alter von ca. 80-89 Jahren, welches die letzte Dekade in der Untersuchung darstellt, ist bei weiterhin steigender Prävalenz wiederum bevorzugt das weibliche Geschlecht betroffen. Der Mechanismus der altersabhängigen Empfänglichkeit für ischämische Herzerkrankungen ist noch nicht geklärt.

Strukturelle Veränderungen dagegen wurden häufig in der Literatur beschrieben. Um sich ein Bild darüber zu verschaffen, seien zugehörige Beispiele aus der Literatur genannt: Auf der zellulären Ebene wird ein Verlust an ventrikulären Myozyten, welcher in den beiden Geschlechtern unterschiedlich ausgeprägt ist, um ca. 35 % im Alter von 30-70 Jahren mit noch ungeklärter Ursache beschrieben. Die verbleibenden Myozyten dagegen erfahren einen Volumenanstieg [24, 25]. Als weiteres morphologisches Charakteristikum sei erwähnt, dass die Masse des linken Ventrikels im Erwachsenenalter bei Männern eine höhere ist als bei Frauen [21].

Als molekulare, altersabhängige Veränderungen, die ihrerseits die Kontraktilität und somit die Pumpfunktion des Herzmuskels beeinflussen, werden einerseits die Reduktion der Proteinkonzentration der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [26] und andererseits die Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum [27] beobachtet. Darüber hinaus kommt es zur

Akkumulation von Kollagen und zur vermehrten Produktion von stressabhängigen Substanzen. Die genannten strukturellen und biochemischen Veränderungen vermindern die kardiale Toleranz gegenüber Erkrankungen abhängig vom Alter und des Geschlechtes. Die Konsequenz der vorangegangenen Beispiele ist, dass sich natürliche Gegebenheiten auf der Proteinebene widerspiegeln. In diesem Zusammenhang kann formuliert werden, dass zelluläre Prozessänderungen von Proteinen ständiger Begleiter in der Lebenszeit eines Organismus sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es für das Aufklären von pathologischen Mechanismen sowie komplexen Zusammenhängen von Herzerkrankungen sinnvoll ist, zunächst grundlegende Untersuchungen durchzuführen; d.h. den Einfluss von Geschlecht, Alter, Entwicklung und genetischer Variabilität in einer Grundlagenstudie konkret zu verfolgen und auf dieser aufbauende Krankheitsmodelle sinnvoll zu studieren. Außerdem kann mit Hilfe einer grundlegenden Proteomanalyse das Phänomen des alters- und geschlechtsspezifischen Auftretens von Erkrankungen auf Proteinebene charakterisiert werden.

## **1.2 Bisherige Erkenntnisse durch die Proteomforschung bei Herz- und Gefäßerkrankungen**

Mit der Proteomforschung wird auf dem Gebiet der Herz- und Gefäßerkrankungen eine wichtige Grundlage geschaffen. Die Erwartungen sind groß, pathologischen Mechanismen durch Charakterisierung der Proteinexpression näher zu kommen und folglich auch aufzuklären. Die Charakterisierung pathologischer Mechanismen bietet eine Grundlage für Innovationen im Hinblick auf die Toxikologie, Therapie und Arzneimittelentwicklung. Das Herausfinden von Proteinen oder Proteingruppen, welche für eine bestimmte Erkrankung oder für ein toxikologisches Verhalten charakteristisch sind, könnte dazu führen, entsprechende Biomarker zu spezifizieren und diagnostisch einzusetzen [28]. Außerdem könne man durch Entwicklung und Einsatz von Arzneimitteln, die diese charakteristischen

Proteine und Proteingruppen je nach Bedarf in ihrer Aktivität hemmen bzw. verstärken, den Therapiebereich verbessern [29].

Im Vordergrund der bisher durchgeführten analytischen Untersuchungen mittels Proteomanalytik stand vorwiegend die Erkrankung der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) [30]. Man verglich die Proteinexpressionsmuster von Herzgewebe, welche mit der 2-DE erfasst wurden, einerseits von Patienten mit DCM und andererseits der zugehörigen, nicht erkrankten Kontrollgruppe [31-34]. Die resultierenden qualitativen Spotunterschiede wurden identifiziert und eine Proteinliste erstellt, in welcher die Proteine nach dem Profil der Hochregulation bzw. Herunterregulation eingeteilt wurden. Allen aufgeführten Literaturstellen konnte entnommen werden, dass bei den Proteinmustern der DCM im Vergleich zu den Proteinmustern der Kontrollgruppe der größte Teil der Proteine herunterreguliert war. Die geringere Zahl bildeten die hochregulierten Proteine. Es ist bemerkenswert, dass bei den Untersuchungen keine Abgrenzung des Geschlechtes erfolgte und das Alter des Patienten unberücksichtigt gelassen wurde. Daher ist entsprechend anzunehmen, dass die als charakteristisch für die Erkrankung der DCM definierten Proteine nicht klar der DCM zuzuordnen sind.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Charakterisierung von mitochondrialen Proteinen des Herzens mittels 2-DE. Mitochondrien übernehmen wichtige Aufgaben in den zellulären Prozessen sowie in vielerlei Erkrankungen [35, 36]. Darüber hinaus bilden sie die Hauptquelle und gleichzeitig das Angriffsziel freier Radikale [37]. Außerdem sind Mitochondrien für die Regenerierung von Antioxidantien, d.h. die Produktion von Reduktionsäquivalenten [38], verantwortlich. Das Resultat ergab zunächst die Konstruktion von mitochondrialen Proteinkarten [39, 40] und darauf aufbauend die Entwicklung von Datenbanken.

Eine Arbeitsgruppe konkretisierte ihre Untersuchungen, in dem sie ein Knock out (KO) Mausmodell für das mitochondriale Enzym Superoxiddismutase 2 (SOD2) [41] mit der 2-DE untersuchte. Die Proteinmuster der KO-Mäuse wurden gegen die Proteinmuster des Wildtyps verglichen. Es ist bekannt, dass ein Fehlen des Gens für dieses Enzym den Phänotyp der DCM hervorruft [35]. Es wurde herausgefunden, dass einige Proteine in dem KO-Mausmodell eine totale Abwesenheit gegenüber dem Wildtyp zeigten und somit den

Zusammenhang der Mutationen in Mitochondrien und Herzerkrankungen bestätigten.

Eine aktuell veröffentlichte Untersuchung einer Arbeitsgruppe beschreibt das Herausfinden von charakteristischen Biomarkern in humanem Serum unter Einsatz von proteombasierenden Methoden [42]. Untersucht wurde humanes Serum verschiedenster Krankheiten, u.a. die kongestive Herzinsuffizienz, im Vergleich zum Kontrollserum. Mit Hilfe der 2-DE und anschließender massenspektrometrischer Analyse konnte eine Zahl von charakteristisch erhöhten Proteinen im Serum der Erkrankten festgestellt werden. Für die kongestive Herzinsuffizienz konnte ein erhöhter Serumspiegel für Haptoglobin und Hämoglobin im Vergleich zum Kontrollserum ermittelt werden. Durch diese Arbeit wird die vielversprechende Anwendung der Proteomforschung bzw. das hochauflösende Auftrennungsvermögen der 2-DE auf dem Gebiet der Diagnostik deutlich.

Zuletzt sei noch eine Arbeit, die in den USA durchgeführt wurde vorgestellt [30]. Die Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit dem obstruktiven Schlafapnoesyndrom (OSAS) verursacht durch eine episodische Hypoxie. Die Hauptfolgeerkrankung der OSAS ist der Bluthochdruck. Man untersuchte proteombasierend die renale Proteinexpression von hypertensiven Ratten unter episodisch bzw. konstant anhaltender Hypoxie in unterschiedlichen Zeiträumen. Hierbei konnte in allen Fällen ein Abfall der Expression des Proteins Kallistatin (Vasodilatator [43, 44]) ermittelt werden. Die verminderte Expression an Kallistatin führte erwartungsgemäß zu einer Reduktion der vasodilatierenden Gefäßkapazität und verursachte bzw. verschlimmerte somit die Hypertension.

Diese Untersuchung ist ein klares Beispiel für das Herausfinden von zellulären und molekularen Mechanismen für die Erkrankung des OSAS und dessen Folgeerkrankung dem Bluthochdruck auf der Ebene der Proteomforschung.

Das Beispiel spiegelt das große Ziel wider, pathologischen Mechanismen verschiedenster und komplexer Erkrankungen näherzukommen und entsprechend aufzuklären. Dafür bietet die Proteomforschung eine fortschreitende Möglichkeit.

## 2. Zielsetzung

Viele Krankheiten, insbesondere genetisch determinierte Krankheiten, treten altersspezifisch auf. Eine naheliegende Erklärung für die Altersabhängigkeit von Krankheiten ist die altersabhängige Expression der Proteine. Die Proteine ändern im Verlauf der Alterung ihre eigene zelluläre Konzentration und in diesem Zusammenhang auch ihre Interaktionspartner. Der genetische Defekt oder die Fehlregulation eines Proteins können daher auch in einem bestimmten Stadium der Entwicklung und Alterung kritischer sein als in einem anderen Stadium. In einem solchen kritischen Stadium kommt dann die Krankheit zum Ausbruch. Daher ist ein Ziel dieser Arbeit, unter Anwendung der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie, Proteine mit altersspezifischer Expression im Herzmuskel der Maus als Modellorganismus nachzuweisen und zu identifizieren. Verwendet wird hierfür die Mausspezies *Mus musculus*, C57BL/6. Die Proteinexpression wird durch unterschiedliche Lebensphasen untersucht: Embryonalphase, Geburtsphase, Postnatalphase und Adultphase. Weiterhin wird der Einfluss unterschiedlicher Lebensspannen auf die Proteinmuster zweier Mäusestämme untersucht. Es handelt sich dabei um männliche DBA/2-Mäuse, die eine Lebenserwartung von ca. 750 Tagen (ca. 107 Wochen) aufweisen, und männliche DBA/1J-Mäuse, die eine Lebenserwartung von ca. 433 Tagen (ca. 62 Wochen) zeigen [45]. Die Proteinmuster der DBA/2-Mäuse werden im Alter von 14 und 100 Wochen, die Proteinmuster der DBA/1J-Mäuse dagegen im Alter von 14 und 60 Wochen verglichen und charakterisiert.

Ein weiteres Ziel soll sein, Proteine mit geschlechtsspezifischer Expression im Herzmuskel der Maus zu studieren, da die Lebensprofile bestimmter Proteine im weiblichen und männlichen Organismus unterschiedlich verlaufen. Untersucht werden C57BL/6-Mäuse, DBA/2-Mäuse der Mausspezies *Mus musculus*. Diese Untersuchung könnte eine mögliche Erklärung auf der Proteinebene geben, weshalb Krankheiten in ihrem zeitlichen Auftreten auch noch ein geschlechtsspezifisches Verhalten zeigen.

Ein weiteres Untersuchungsziel ist der Einfluss der genetischen Variabilität auf die Proteinmuster zweier sich genetisch unterscheidender Mausspezies, *Mus musculus* (C57BL/6) und *Mus spretus* (MSPR). Es sollen dabei häufig

vorkommende Proteinpolymorphismen aufgeklärt werden, die den Aspekt der genetischen Variabilität im Zusammenhang mit dem alters- und geschlechtsabhängigen Auftreten von Krankheiten mit einbringen.