

5. Diskussion

Das Ziel der Arbeit war die Proteomanalyse des Herzmuskels unter der Frage nach der Abhängigkeit der Proteinexpression von Alter, Geschlecht, genetischer Variabilität und Lebensspanne.

5.1 Proteinexpression in Abhängigkeit von Entwicklung und Alter

Der Vergleich und die Auswertung der Proteinexpressionsmuster der Embryonalphase, Geburtsphase, Postnatalphase und der Adultphase von C57BL/6-Mäusen ermöglichte die Charakterisierung der altersspezifischen Proteinexpression.

Dabei konnten für die untersuchten Lebensphasen Spotunterschiede zwischen den Stadien erfasst werden. Die variablen Spots entsprechen Änderungen der Intensität und des Volumens der Proteinspots (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden). Für die Embryonalphase konnten 37 (1,2 %) variable Proteinspots, für die Geburtsphase 104 (3,4 %) variable Proteinspots, für die Postnatalphase 101 (3,3 %) variable Proteinspots und für die Adultphase 86 (2,8 %) variable Proteinspots ausgewertet werden. Hierbei konnten für die Geburtsphase 68 Proteinspots der 104 Spotunterschiede mit hochreguliertem Spotprofil festgestellt werden. Für die Postnatalphase konnten 60 Proteinspots der 101 Spotunterschiede mit herunterreguliertem Spotprofil ausgewertet werden.

Um die Altersabhängigkeit der Proteinexpression in der Entwicklung aussagekräftiger zu untersuchen, wurden mit der Massenspektrometrie für die Geburtsphase 49 Spots und für die Adultphase 43 Spots der Spotunterschiede in ihrer Identität (vgl. Tabelle 1,2 im Anhang) bestimmt und miteinander verglichen. Neun Proteine (Geburt: 17 Spots; Adult: 14 Spots) konnten in beiden Lebensphasen als identisch vorkommend erfasst werden. Restliche Proteine (Geburt: 32 Spots; Adult: 29 Spots) waren in der Geburts- und Adultphase unterschiedlich.

Aus den aufgeführten Ergebnissen der vorliegenden Grundlagenstudie lässt sich zunächst folgern, dass die sich in ihrer Expression verändernden

Proteinspots des Herzmuskels für die untersuchten Lebensphasen der Entwicklung in einem prozentualen Intervall von ca. 1-3 % liegen. Hierbei zeigten die Geburtsphase, Postnatalphase und die Adultphase die höchsten Änderungen in der Expression. Die Embryonalphase zeigte dagegen die geringsten Änderungen in der Expression. In der Geburtsphase sind die Proteine größtenteils in der Expression verstärkt. Dagegen ist in dem darauffolgenden Postnatalstadium der größte Teil der Proteine in ihrer Expression vermindert. Eine naheliegende Erklärung für den genannten Sachverhalt ist die Anpassung des embryonalen bzw. neugeborenen Organismus beim Übergang vom intra- zum extrauterinen Leben. In der Embryonalphase ist der Embryo durch den Blutkreislauf mit einem Sauerstoffgehalt kleiner 3% [59] versorgt. Zum Zeitpunkt der Geburt entspricht der Sauerstoffgehalt der Atmung 20-21% [59]. Daher ist eine verstärkte Induktion der Proteinexpression zu beobachten, die eine bestimmte Gruppe an Proteinen umfasst. Die reduzierte Proteinexpression in der darauffolgenden Postnatalphase lässt auf ein Akklimatisieren des Organismus schließen. Wie erwähnt, zeigt die Embryonalphase die geringsten Änderungen in der Proteinexpression. Dieses lässt sich durch die maternale Versorgung des Embryos erklären [60]. Das variable Proteinverhalten in der Adultphase könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass sich Umwelteinflüsse (Ernährung, Gesundheit, Stress...) stärker auswirken und die im Laufe des Alters vermehrt auftretenden, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Proteine, Lipide und das Erbgut schädigen [61]. Dies hat zur Folge, dass die Signaltransduktion, Genexpression, der Metabolismus, das Wachstum und die Differenzierung nachteilig beeinflusst werden [62, 63]. Daher unterscheiden sich die Proteine der Adultphase von denen der Geburtsphase in ihrer Expression, Identität und Funktion.

In einem weiteren Schritt wurden die altersabhängigen Proteinspots ausgewertet, d.h. Proteinspots, die eine Änderung ihres Spotprofils in mindestens zwei Lebensstadien (vgl. 4.2.2) zeigten. Hierbei konnte eine Zahl von 28 altersabhängig variablen Proteinspots festgehalten werden. Der prozentuale Anteil beträgt ca. 0,9 % gemessen an der Gesamtspotzahl des Proteinmusters des Herzmuskels. Diese altersabhängigen Proteinspots zeigten

ein identisches sowie unterschiedliches Spotprofil in den jeweiligen Lebensstadien.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die Proteinexpression aufgrund der gering festgestellten Spotunterschiede im Herzmuskel über die Entwicklung nahezu konstant ist. Eine weitere Erklärung liegt in der Morphologie des Herzmuskels. In der frühen Postnatalphase der Entwicklung des Herzmuskels erfolgt keine Differenzierung neuer Kardiomyozyten. Die im Herzmuskel vorhandenen Kardiomyozyten weisen demnach das gleiche Alter wie das Individuum auf [64, 65].

5.1.1 Vorkommen bzw. Nichtvorkommen von Proteinen in bestimmten Lebensphasen

Ein weiteres Untersuchungsziel im Hinblick auf die Charakterisierung der Proteine in Abhängigkeit von Entwicklung und Alter, war das Erfassen von Proteinen, die ein **Vorkommen bzw. Nichtvorkommen in bestimmten Lebensphasen** aufweisen. Diese Proteine bzw. Proteingruppen treten/treten nicht in allen Lebensstadien der untersuchten Lebensphase auf. Solch ein Verhalten zeigte das Protein Peroxiredoxin 2, welches in dem nächsten Kapitel beschrieben wird.

5.1.1.1 Charakteristika des Peroxiredoxin 2 in der Entwicklung

In eigener Untersuchung konnten sechs Proteinspots mit massenspektrometrischer Analyse als Peroxiredoxin 2 identifiziert werden. Es ist davon auszugehen, dass diese sechs Isoformen posttranslational, oxidativ modifiziert vorliegen [66, 67]. Der Vergleich der Proteinmuster der Embryonalphase, Geburtsphase, Postnatalphase und Adultphase ergab ein ausschließliches Auftreten von drei der sechs Proteinspots in der Embryonalphase bis einschließlich dem Zeitpunkt der Geburt. Die Spotintensitäten der drei Proteinspots zeigten eine Abnahme innerhalb der Embryonalphase und konnten nach dem Zeitpunkt der Geburt in den Proteinexpressionsmustern der darauffolgenden Postnatal- und Adultphase

nicht mehr identifiziert werden. Die weiteren drei Proteinspots konnten in allen untersuchten Stadien der Entwicklung identifiziert werden. Ihre Spotintensitäten zeigten unterschiedliche Werte für die einzelnen Stadien, so dass diesbezüglich keine besonderen Auffälligkeiten verzeichnet werden konnten.

Peroxiredoxin 2 ist ein ubiquitär im Zytosol vorkommendes Protein. Es ist das zweit- bzw. dritthäufigst vorkommende Protein in den Erythrozyten [68]. Peroxiredoxin 2 gehört zu der Gruppe der thiol-spezifischen Proteine mit antioxidativer Funktion [55, 56]. Ein bevorzugtes Auftreten des Peroxiredoxin 2 im Herzmuskel konnte der Literatur entnommen werden [69].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der Entwicklung sechs oxidativ modifizierte Isoformen des Peroxiredoxin 2 vorkommen. Zusätzlich wurde ein für die Embryonalphase bis einschließlich des Zeitpunktes der Geburt charakteristisches Auftreten dreier Isoformen des Peroxiredoxin 2 festgestellt.

5.1.1.2 Bewertungen des Peroxiredoxins 2 in der Entwicklung

Die Funktionen der Peroxiredoxine sind facettenreich [70]. Durch ihre antioxidative Eigenschaft bieten sie der Zelle Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS, wie das Superoxidanionradikal, Hydroxylradikal, Hydrogenperoxid sowie die Lipidperoxide werden von unterschiedlichen Zelltypen gebildet [63, 71]. Darüber hinaus sind Peroxiredoxine in die Regulation unterschiedlicher Signaltransduktionswege involviert. Dieses erklärt ihren Einfluss auf die Zellteilung, das Zellwachstum und die Apoptose [72]. Eine weitere Rolle übernehmen die Peroxiredoxine in der Differenzierung der Erythrozyten [73].

Das Identifizieren von sechs Proteinspots (Isoformen) als Peroxiredoxin 2 in der Entwicklung lässt auf eine wichtige Rolle in der Redoxregulation der zellulären Differenzierung und Entwicklung des Herzmuskels schließen. Dieser Sachverhalt ist in einer Arbeit einer Arbeitsgruppe untersucht worden. Hierbei wurden verschiedene Blutzellen zur Differenzierung angeregt und deren Extrakte mit der 2-DE dargestellt. In den Proteinmustern wurde die Intensität des „sauren Peroxiredoxin“ bestimmt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass erythroide Zellen (Proerythroblast, Erythroblast, Erythrozyt) ein erhöhtes Level an „saurem Peroxiredoxin“ aufweisen im Vergleich zu nichterythroiden Zellen

(Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten) [73]. Innerhalb der erythroiden Zellen wiesen die differenzierten Erythrozyten die höchste Expression des „sauren Peroxiredoxins“ auf.

Das ausschließliche Identifizieren dreier Isoformen des Peroxiredoxin 2 (oxidativ modifiziert) in der Embryonalphase bis einschließlich dem Zeitpunkt der Geburt, bedingt hierbei eine erhöhte Redoxregulation des Organismus [73]. Ein Zusammenhang kann damit erklärt werden, dass ein vermehrtes Vorhandensein von ROS im maternalen Blut [74-77] eine Erhöhung der ROS im Embryo zur Folge hat. Außerdem bedingen die verstärkte Zellproliferation und Differenzierung des Embryos ein vermehrtes Auftreten von ROS [78-80]. Es kommt u.a. zur Initialisierung von Apoptose durch die ROS [63]. Die Apoptose ist für die Zelleliminierung in der Morphogenese essentiell [59]. Hierbei begünstigt der Zelltod auch die Bildung von ROS [81]. Aufgrund des daraus vermehrten Vorhandenseins an ROS in der Embryonalentwicklung ist eine verstärkte Redoxregulation durch das Peroxiredoxin 2 notwendig. Das Überangebot an ROS bedingt eine vermehrte Expression von Peroxiredoxin 2. Das Auftreten von sechs oxidativ modifizierten Isoformen lässt sich folgendermaßen erklären: Die vermehrt vorhandenen ROS bedingen die Aktivierung von kalziumabhängigen Proteasen, die ihrerseits die Oxidation der Thiolgruppen von Proteinen und damit die Proteolyse fördern [82]. Es kommt zur Oxidation des Peroxiredoxin 2 am aktiven Cystein (Sulfensäure, Sulfonsäure, Disulfid... [66, 67]). Das Peroxiredoxin 2 besitzt zwei redoxaktive Cysteine [56]. Daher können mehrfache Oxidationsprodukte gebildet werden, welche sich als mehrgliedrig auftretende Proteinspots auf dem Proteinmuster zeigen. Durch die Oxidation erfolgt ein „Hinzukommen“ an negativer Ladung und bedingt eine Verschiebung der Proteinspots zu niedrigerem pI Wert [83, 84]. Prinzipiell ändern Modifizierungen die Eigenschaften eines Proteins und führen damit zu der Regulation der Enzymaktivität [56, 85-88].

5.1.1.3 Peroxiredoxin 2 und das altersspezifische Auftreten von Krankheiten

Die Untersuchung der Proteinexpression in der Entwicklung und Alterung bildet eine Grundlage für aufbauende Untersuchungen des altersspezifischen

Auftretens von Krankheiten. Das Peroxiredoxin 2, welches in der Embryonalphase bis einschließlich der Geburt eine wichtige Rolle in der Redoxregulation gegenüber vermehrt auftretenden ROS besitzt (sechs Isoformen) und in der Adultphase durch eine abnehmende Redoxregulation (drei Isoformen) gekennzeichnet ist, könnte ein Hinweis für das altersspezifische Auftreten von Erkrankungen und der Proteinexpression der Peroxiredoxine sein.

In der Literatur wird eine vermehrte Expression des Peroxiredoxin 2 durch die Induktion von ROS beschrieben [83, 84]. Ebenso wurde bei Erkrankungen, die für die ROS anfällig sind, eine erhöhte Expression an Peroxiredoxin 2 [89] festgestellt. Als Vertreter werden die Alzheimer'sche, Parkinson'sche Erkrankung sowie die Erkrankung der Athereosklerose genannt. Diese genannten Krankheiten zeichnen sich u.a. dadurch aus, dass sie in dem höheren menschlichen Lebensalter auftreten. Möglicherweise kann in diesem Zusammenhang eine grundlegende Beziehung zu der im höheren Lebensalter abnehmenden Kapazität der Redoxregulation des Organismus geschaffen werden.

Wie erwähnt, ist die Belastung durch die ROS und die Expression von Peroxiredoxin 2 in genannten Erkrankungen erhöht. Durch das Überangebot an ROS besteht die Möglichkeit, dass cysteinhaltige Proteine der Zelle oxidiert werden [90]. Es kommt zu einer Zerstörung von Zellstrukturen und damit zur Abschwächung der gesamten antioxidativen Wirkung der Zelle. Eine Zerstörung wichtiger zellulärer Strukturen kann zu einer Anhäufung des Peroxiredoxin 2 führen. Somit wirkt das Peroxiredoxin 2 durch partielle Oxidation nur noch teilweise antioxidativ und ist in seiner Redoxregulationskapazität eingeschränkt. In diesem Stadium könnte das Auftreten von Erkrankungen begünstigt sein.

In der Adultphase konnten drei Isoformen des Peroxiredoxin 2 identifiziert werden und in der Embryonalphase bis einschließlich dem Zeitpunkt der Geburt sechs Isoformen des Peroxiredoxin 2. Daher wird davon ausgegangen, dass die Kapazität der Redoxregulation des Peroxiredoxin 2 aufgrund der geringeren Zahl an Proteinspots (Isoformen) im höheren Stadium verändert bzw. reduziert ist [91, 92].

5.2 Charakterisierung der geschlechtsspezifischen Proteinspots der C57BL/6- und DBA/2-Mäuse

Der Vergleich der Proteinmuster der C57BL/6- und DBA/2-Mäuse beider Geschlechter ermöglichte das Herausfinden von geschlechtsspezifischen Proteinen.

Die miteinander verglichenen Proteinmuster beider Mäusstämme wiesen eine geringe Zahl an geschlechtsspezifischen Proteinspots auf. Für die C57BL/6-Mäuse konnten 29 geschlechtsspezifische Proteinspots (0,94 %) ausgewertet werden. Der Vergleich der Proteinmuster der DBA/2-Mäuse ergab 20 geschlechtsspezifische Proteinspots (0,65 %). Beim Quervergleich der geschlechtsspezifischen Proteinspots beider Mäusestämme konnten sechs Spots als Schnittmenge für geschlechtsspezifische Proteinspots festgestellt werden.

Ein auffällig geschlechtsspezifischer Unterschied ergab sich bei den Proteinmustern der 100. Woche der C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter. Es konnten vier geschlechtsspezifische Proteine in den männlichen Proteinmustern aus der Gruppe der Apolipoproteine identifiziert werden.

Sechs Proteinspots (Doppelspot als ApoA2, ApoE, dreifache Spotgruppe als ApoJ) waren ausschließlich in den männlichen Proteinmustern (vgl. 4.3.1) present. Drei Proteinspots (ApoA4) waren in den männlichen Proteinmustern stark hochreguliert. Außerdem traten die Proteine ApoA2, ApoA4, ApoJ als mehrgliedrige Proteingruppen (Isoformen) auf.

Neben diesen Erkenntnissen konnten drei weitere Proteinspots in den Proteinmustern der C57BL/6-Mäuse (14. und 100. Woche) mit geschlechtsspezifischem und altersspezifischem Auftreten identifiziert werden. Die drei Proteinspots entsprechen dem α 1-Antitrypsin folgender Isoformen: 1-1, 1-3, 1-5. Die Isoformen waren in den Proteinmustern der 14. Woche in beiden Geschlechtern vorzufinden. In den Proteinmustern der 100. Woche zeigten sich diese drei Isoformen nur noch in dem männlichen Geschlecht.

5.2.1 Bewertung der geschlechtsspezifischen Apolipoproteine der C57BL/6-Mäuse

Die Proteine **ApoE**, **ApoA2**, **ApoJ** und das **ApoA4** gehören zur Gruppe der Apolipoproteine und weisen eine große Vielfalt in ihren Funktionen auf. Diese genannten Apolipoproteine konnten als geschlechtsspezifische Proteine in den C57BL/6-Mäusen (100. Woche) charakterisiert werden.

Die Funktionen der Apolipoproteine werden in nahem Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus beschrieben. Doch weißt jedes der genannten Apolipoproteine eine Vielzahl weiterer Zusammenhänge in unterschiedlichste Sachverhalte auf.

Das Apolipoprotein J (dreigliedrige Spotgruppe) ist ein ubiquitär vorkommendes Protein [93]. Es wird als ein als Heterodimer vorkommendes Protein mit unterschiedlichsten Modifikationen beschrieben [94]. Bei biologischen Prozessen spielt es in dem Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle [95, 96]. ApoJ wird auch in Zusammenhang mit der Apoptose [58] [93, 97, 98], der Proteinfaltung aufgrund chaperonähnlicher Aktivität [99] und diversen Tumorerkrankungen [100, 101] sowie dem Alterungsprozess [102] gebracht.

Das ApoA2 (Doppelpot) wird in der Literatur als ein Bestandteil der in den Cholesterollowerstand involvierten Lipoproteinpartikel HDL (high density lipoproteins) beschrieben [103]. Es ist mit dem Apolipoprotein A1 (ApoA1) an die HDL Partikel gebunden. Somit besitzen diese beiden Apolipoproteine antagonistische Wirkung. Bezüglich seiner biologischen Funktionen wird das entgegengesetzte Verhalten zum ApoA1 beschrieben. Das bedeutet, keine athereoprotektive und antiinflammatorische Wirkung [104, 105] des ApoA2.

Das Apolipoprotein E wird u.a. als Bestandteil der Lipoproteine VLDL (very low density lipoproteins), HDL und den Chylomikronen beschrieben. Dieses unterstreicht seine beteiligende Rolle in dem Lipidmetabolismus [106, 107]. Die Wirkweise des ApoE ist sehr facettenreich. Beispielsweise wird diesem eine athereoskleroseprotektive, immunmodulatorische als auch antiproliferative [108] und antioxidative [109] Wirkweise zugesprochen.

Das in den beiden Geschlechtern vorkommende, dennoch in den männlichen Proteinmustern stark hochregulierte ApoA4 (dreigliedrige Spotgruppe), ist der Literatur nach in den Lipidmetabolismus bzw. den Cholesterollücktransport

involviert [110, 111]. Es besitzt somit protektive Wirkung gegenüber der Atherosklerose.

Aus den facettenreichen Funktionen der Apolipoproteine konnte ein Zusammenhang mit der Stoffwechselregulation (Lipidmetabolismus) gefolgert werden. Das ausschließliche Vorkommen von ApoE, ApoA2, ApoJ und stark hochregulierten ApoA4 in den männlichen Proteinmustern (100.Woche) lässt auf eine geschlechtsspezifische Regulation des Lipidmetabolismus im höheren Alter schließen. Dieses wird auch durch das Auftreten der Apolipoproteine als mehrgliedrige Spotgruppen (ApoA2, ApoJ, ApoA4) unterstützt. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass möglicherweise posttranslationale Modifikationen von genannten Apolipoproteinen im höheren Alter des Organismus charakteristisch sind für das männliche Geschlecht. Wie erwähnt tritt im höheren Alter (Alterungsprozess) ein vermehrtes Auftreten von ROS auf. Hierbei ist das weibliche Geschlecht weniger anfällig gegenüber ROS aufgrund umfangreicherer Protektion, d.h. erhöhte Level an Enzymen (Superoxiddismutase2, Glutathionperoxidase), die die ROS inaktivieren. Das vermehrte Vorhandensein an ROS und der geringere Schutz gegenüber den ROS in dem männlichen Geschlecht hat eine erhöhte Lipidoxidation zur Folge [112, 113]. Der Prozess der Lipidoxidation beinhaltet sowohl die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren als auch die Oxidation der Apolipoproteine. Dieses erklärt das Auftreten von mehrfach auftretenden Proteinspots des gleichen Apolipoproteins. Außerdem belegt das bevorzugte Auftreten der Apolipoproteine in dem männlichen Organismus und die hierbei vertärkte Lipidoxidation (PTM; mehrgliedrig vorkommende Proteinspots) die Tatsache, dass die Lipidoxidation älterer Männer erhöht ist gegenüber der Lipidoxidation älterer Frauen [114, 115].

5.2.1.1 Das geschlechtsspezifische Auftreten der Apolipoproteine und die Beziehung zu kardiovaskulären Erkrankungen

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Studien, in denen der Zusammenhang des Auftretens von kardiovaskulären Erkrankungen und der Geschlechtsspezifität untersucht und beschrieben wurde. In eigener Untersuchung konnten (vgl. Kapitel 5.2 und 5.2.1) die Apolipoproteine A2, E, J

ausschließlich in den männlichen Proteinmustern (100. Woche) festgestellt werden. Das ApoA4 konnte hierbei als stark hochreguliert beobachtet werden. Von Bedeutung ist die Rolle der Lipoproteine/Apolipoproteine und der Zusammenhang mit der Erkrankung der Athereosklerose [116, 117]. Die Athereosklerose wird u.a. durch eine Akkumulation von Lipiden in den großen Arterien beschrieben [118, 119]. Es konnte gezeigt werden, dass eine bevorzugte Inzidenz für die Erkrankung der Athereosklerose im menschlichen Lebensalter von ca. 50 Jahren bei dem männlichen Geschlecht besteht [120]. Außerdem ist die Inzidenz bei Frauen in der Prämenopause sehr gering und steigt im Laufe der Postmenopause an [121].

Wie unter 5.2.1 sind die biologischen Funktionen der in eigener Untersuchung ermittelten Apolipoproteine in Bezug auf die Erkrankung der Athereosklerose gegensätzlich. Das Auftreten der Apolipoproteine A2, A4 und ApoJ als mehrgliedrige Proteinspotserien (PTM, Proteinoxidation), wurde in Zusammenhang mit der erhöhten Lipidoxidation in dem älteren männlichen Geschlecht durch vermehrtes Auftreten von ROS (Alterungsprozess) gebracht (vgl. 5.2.1). Eine verstärkte, manifestiert auftretende Lipidoxidation begünstigt bekannterweise kardiovaskuläre Veränderungen [113]. Außerdem stellt die Oxidation von Lipoproteinen einen wichtigen Schritt bei der Entstehung der Athereosklerose und koronarer Herzerkrankung dar [112]. Damit ist eine Grundlage für geschlechtsspezifisch auftretende Proteine und den daraus möglich resultierenden Erkrankungen gelegt.

5.2.2 Geschlechts- und altersspezifisches Auftreten des α 1-Antitrypsins

Das Auftreten des α 1- Antitrypsins als eine mehrgliedrige Proteinspotgruppe verschiedener Isoformen auf 2-DE Gelen ist bekannt und beschrieben (www.expasy.ch/ch2d/).

Das Enzym α 1- Antitrypsin stellt ein Serinproteaseinhibitor (SERPIN) dar [122-124] und ist in unterschiedlichste biologische Prozesse [125, 126] involviert. Darunter die Beteiligung an der Blutkoagulation, Fibrinolyse, Proliferation als auch an der Komplementsystemaktivierung. Dagegen fällt die

Blutdruckregulation als auch der Hormontransport in den nichtinhibierenden Aufgabenbereich der Serpine.

Die Isoformen 1-1, 1-3, 1-5 des α 1- Antitrypsins zeigten in eigener Untersuchung an den C57BL/6-Mäusen (14. und 100. Woche) sowohl ein geschlechtsspezifisches als auch ein altersspezifisches Auftreten, was möglicherweise mit der Vielseitigkeit seiner biologischen Funktionen erklärt werden kann. Einerseits ist das α 1- Antitrypsin in altersabhängige proliferative Prozesse und andererseits in den Hormontransport und Homöostase, die geschlechtsabhängig sind, involviert [127].

5.3 Einfluss der genetischen Variabilität auf die Proteinmuster von *Mus musculus* und *Mus spretus*

In der vorliegenden Grundlagenstudie wurde der Einfluss der genetischen Variabilität auf die Proteinmuster des Herzmuskels der Maus an den zwei Spezies *Mus musculus* (Mm) und *Mus spretus* (MSPR) untersucht.

5.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der genetischen Variabilität

Der Vergleich der Proteinmuster der beiden Mausspezies *Mus musculus*, C57BL/6 und *Mus spretus* (14. Woche) ergab 160 polymorphe Proteinspots - Proteinpolymorphismen (vgl. 4.4.1). Hierbei waren qualitative Veränderungen, wie Positionsverschiebungen der Proteinspots in horizontaler, vertikaler und diagonaler Richtung, vertreten. Diese bildeten mit ca. 36 % den größten Anteil. Der andere Teil der Veränderungen der Proteinspots betraf ihre Intensität und das Volumen (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden). Weiterhin wurden die altersabhängigen Proteinpolymorphismen untersucht. Hierbei wurden die 160 Proteinpolymorphismen (14. Woche, beider Spezies) mit den Proteinmustern der 100. Woche beider Spezies verglichen und Änderungen des Spotprofils erfasst. Allerdings, konnten keine altersabhängigen Proteinpolymorphismen aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit in allen existierenden Gelpaaren festgestellt werden (siehe Tabelle 35) und sind demnach nicht aussagekräftig. Dennoch kann gesagt werden, dass die meisten der 160 ermittelten Proteinpolymorphismen nicht altersabhängig sind.

Des Weiteren wurden die über die Entwicklung als altersabhängig (vgl. Kapitel 4.4.1.1) variabel ermittelten Proteinspots auf die Frage untersucht, ob diese polymorph/nicht polymorph sind. Es war festzustellen, dass von den 28 altersabhängig variablen Proteinspots, 16 Spots polymorph und 12 Spots nicht polymorph waren (vgl. Tabelle 36, 37).

Auch die geschlechtsspezifischen Proteinspots der Stämme C57BL/6, DBA/2 wurden auf Polymorphismen untersucht. Hierbei waren die als geschlechtsspezifisch identifizierten Proteine der C57BL/6-Mäuse nicht polymorph. Dagegen waren sieben von zwanzig geschlechtsspezifischen Proteinspots der DBA/2-Mäuse polymorph.

5.3.2 Einfluss des genetischen Polymorphismus auf die Proteinexpression

Eine Grundlage für die Korrelation des Genotyps und Phänotyps stellt die eigene Untersuchung von Proteinpolymorphismen der Mausspezies *Mus musculus* und *Mus spretus* sowie dessen Vergleich mit altersabhängig variablen und geschlechtsspezifischen Proteinspots dar.

Die Proteine sind wichtig für die Charakterisierung wichtiger Information des Erbgutes [128]. Es ist daher von Bedeutung, Gene und dessen resultierende Proteine, die der Beeinflussung von Krankheiten, der Alterung und Entwicklung unterliegen, zu identifizieren. Polymorphe Gene bedingen Modifikationen, die interindividuelle Unterschiede in dem genetischen Hintergrund bewirken. Solche interindividuellen Unterschiede können auf der Ebene der Proteine charakterisiert werden (Proteinpolymorphismen). Hierbei ändert sich die Proteingröße und die Proteinladung [129]. Proteinpolymorphismen zeigen sich in der qualitativen und quantitativen Veränderung ihrer elektrophoretischen Mobilität [130]. In eigener Untersuchung konnten 160 solcher Proteinpolymorphismen in den Proteinmustern der Mausspezies *Mus musculus* und *Mus spretus* (14. Woche) festgestellt werden.

Ein wichtiges Beispiel für einen genetischen Polymorphismus und dessen Beeinflussung der Proteinexpression ist die variable Enzymaktivität des Cytochrom-P450-Systems [131]. Das Cytochrom-P450-Enzym (CYP450) ist ein

essentielles Hämoprotein, das in allen Lebewesen nachgewiesen wurde. Beim Menschen gibt es ca. 25 Isoenzyme [132]. Die Hauptlokalisierung ist in der Leber. Sie befinden sich auch im Darm, Pankreas, Niere...[132]. Ihre Aufgabe besteht darin Medikamente und Umweltchemikalien zu verstoffwechseln (Biotransformation). Unter Biotransformation versteht man die Umwandlung von aktiven, fettlöslichen und ausscheidungsunfähigen Medikamenten in meist inaktive und wasserlösliche Substanzen (Niere). Außerdem wirken diese am oxidativen und reduktiven Metabolismus von endogenen Substanzen (Steroidhormone, Prostaglandine...) mit. Zahlreiche Isoenzyme des CYP450 zeigen einen genetischen Polymorphismus [133]. Beispielsweise weisen 6-7 % der Europäer und 1 % der Asiaten einen Mangel des Isoenzym CYP2D6 auf. Das Fehlen von CYP2D6 beeinträchtigt den Metabolismus von Opiaten, wie Codein und Tramadol (Analgetikum, Antitussivum). Abhängig vom Grad der Genexpression unterscheidet man schlechte, schnelle und ultraschnelle Verstoffwechsler [134]. Dies bedeutet, dass ein schlechter Verstoffwechsler (CYP2D6-Gendefekt) von einer Behandlung mit Tramadol nicht profitiert. Im Gegensatz dazu, zeigt ein ultraschneller Verstoffwechsler bei üblichen Dosierungen verstärkte Nebenwirkungen durch die Abbauprodukte.

Im Folgenden wird auf krankheitsassoziierte Polymorphismen eingegangen. In den letzten Jahren wurde eine wachsende Zahl von Genpolymorphismen identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankungen assoziiert sind [135]. Die hierbei untersuchten Genpolymorphismen sind unter anderem Varianten des Apolipoproteins E, Fibrinogens, Angiotensin-Converting-Enzyms... [136, 137]. Hierbei wird auf den Genpolymorphismus des ApoE eingegangen. Apolipoprotein E ist ein wichtiges Strukturprotein der Chylomikronen, VLDL und der HDL [138]. Es wird vorwiegend in der Leber gebildet und dient als Ligand für die zelluläre Aufnahme genannter Lipoproteine über LDL-rezeptoren [138]. ApoE liegt in drei Isoformen vor: ApoE2, ApoE3 und ApoE4. Die Synthese der Isoformen wird von drei unabhängigen Allelen kontrolliert. Diese drei Allele sind durch zwei Genpolymorphismen generiert [139]. Sie unterscheiden sich durch die Substitution von Arginin durch Cystein in Position 158 (ApoE2) bzw. in Position 112 (ApoE4). In ApoE3 ist Arginin nicht substituiert. Eine Literaturstelle beschreibt, dass ca. 8 % der Myokardinfarkte auf einen ApoE-Polymorphismus zurückzuführen sind [140]. Des Weiteren

konnte festgestellt werden, dass Individuen mit dem ApoE4-Allel erhöhte Plasma-Cholesterinkonzentrationen aufweisen [141]. Dieses erklärt die Prädisposition für die Entwicklung einer Hypercholesterinämie. Neben der Assoziation des ApoE-Polymorphismus mit der koronaren Herzerkrankung, wurde vor einigen Jahren auch ein Bezug zur Alzheimer'schen Erkrankung entdeckt [142]. Das ApoE4-Allel findet sich bei Patienten mit Morbus Alzheimer etwa vierfach häufiger als bei Kontrollpatienten [143]. Einige Literatur beschreibt die Altersabhängigkeit und den ApoE-Polymorphismus. 1994 wurde in einer Arbeit das ApoE4 Allel mit einer verminderten Lebensspanne assoziiert [144]. Einer aktuellen Veröffentlichung kann entnommen werden, dass das ApoE4-Allel, im Vergleich zu ApoE2 und ApoE3, mit einer frühzeitigen Menopause der Frauen einhergeht [145].

Genetische Polymorphismen beeinflussen die Proteinexpression. Dieser Sachverhalt spiegelt sich, wie in dargestellten Beispielen, u.a. in einer veränderten Metabolisierung, als auch in der Entstehung unterschiedlicher Erkrankungen, wieder. Auch eine Beziehung von Polymorphismen und der Altersabhängigkeit wird aufgeführt. Dies belegt die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen auf der Proteinebene, um den Genotyp und Phänotyp zu korrelieren. Hierbei hat die Aufklärung von Proteinpolymorphismen eine zentrale Stellung. Aufbauend darauf könnten verschiedene Krankheitsbilder studiert werden.

5.4 Charakterisierung des Einflusses unterschiedlicher Lebensspannen auf die Proteinmuster von DBA/1J- und DBA/2-Mäusen

Wie unter 4.5 beschrieben wurde der Einfluss unterschiedlich langer Lebensspannen zweier Mäusestämme auf die Proteinmuster untersucht. Es sollten Proteine charakterisiert werden, die für eine vorzeitige Alterung eines Organismus verantwortlich sind.

Der Vergleich der Proteinmuster der DBA/1J- und DBA/2-Mäuse ergab wenige Spotunterschiede (Polymorphismen). Hierbei zeigte der Vergleich der

Proteinmuster DBA/1J vs. DBA/2, 14. Woche, 12 variable Proteinspots. Der Vergleich der Proteinmuster DBA/1J, 60. Woche vs. DBA/2, 100. Woche ergab 19 variable Proteinspots. Wenige dieser Spots zeigten eine Altersabhängigkeit (vgl. Tabelle 41). Ein auffällig hochregulierter Proteinspot konnte in den Proteinmustern der 60. Woche der DBA/1J-Mäuse beobachtet werden. Der Proteinspot war in den Proteinmustern beider Mäusestämme (14. Wochen) in seiner Spotintensität nahezu identisch. Dieser konnte als ein Gemisch aus NADH-Dehydrogenase-FeS-protein und NADH-Oxidoreduktase 30 kDa-subunit identifiziert werden.

5.4.1 Bewertung des Einflusses unterschiedlicher Lebensspannen auf die Proteinmuster der DBA/1J- und DBA/2-Mäuse

Im Laufe der Alterung eines Organismus treten multifaktoriell vermehrt ROS auf [71, 82, 146]. Das Überangebot an ROS bedingt die Schädigung der DNA, der Proteine durch die Oxidation freier Thiolgruppen sowie der Lipide durch Lipidperoxidation. Als Abwehrmechanismus kommt es zur Aktivierung von verschiedenen Reparatursystemen. Beispielsweise kommt es zur Aktivierung des antioxidativen Systems, d.h. Enzyme wie die Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase und die Katalasen. Diese bewirken eine Inaktivierung der vermehrt auftretenden ROS.

In eigener Untersuchung konnte das Proteingemisch der NADH-Dehydrogenase-FeS-protein, NADH-Oxidoreduktase 30 kDa-subunit als auffällig, hochreguliert exprimiert in den DBA/1J-Mäusen (60. Woche) identifiziert werden. Die DBA/1J-Mäuse weisen die kürzere Lebensspanne (ca. 62 Wochen) auf. Beide identifizierten Proteine zeigen der Literatur nach eine erhöhte Expression bei vermehrt auftretenden, freien ROS [147-151]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine vermehrte Bildung von freien ROS in den DBA/1J-Tieren mit der kürzeren Lebensspanne erfolgte. Dies erklärt, dass die DBA/1J-Tiere kürzer leben, da sie schneller altern und vielleicht genauso alt oder älter als die DBA/2, 100 Wochen sind.

Dennoch zeigten sich in den Proteinmustern der untersuchten Mäusestämme geringfügige Unterschiede. Zwölf unterschiedliche Spots konnten in dem Vergleich der jeweiligen 14. Woche festgestellt werden. Dagegen konnten 19

variable Spots in dem Vergleich der 60.Woche/100.Woche festgestellt werden. Prinzipiell wären mehrfach Spotunterschiede zu erwarten gewesen, vor allem Proteine, die in das antioxidative System involviert sind, aufgrund des mit zunehmendem Alter vermehrten Auftretens von ROS. Weiterhin ist das Altern durch die Anhäufung von akkumulierten oxidierten Proteinen gekennzeichnet [91]. Die Beseitigung oxidierter Proteine in gealterten Zellen erfolgt nur unvollständig. Demnach wären auch Proteine, die einer Protein-Alterung durch posttranslationale Modifikationen (Oxidation) unterliegen, denkbar gewesen. Auch posttranslationale Phosphorylierungen von Proteinen beeinflussen die Proteinsynthese, Zellteilung, Entwicklung und den Alterungsprozess. Beispielsweise beschreibt eine Arbeitsgruppe, dass die Proteine der Linse des menschlichen Auges – die Kristalline, altersabhängigen Phosphorylierungen unterliegen [152, 153]. Dies hat u.a. eine vermehrte Aggregation und schließlich eine verminderte Löslichkeit der Kristalline zur Folge. Dadurch entwickelt sich eine Linsentrübung als Krankheitsbild. Solche PTM hätten sich im Proteinmuster als mehrgliedrige Spotgruppen mit einer veränderten Position (zu niederen pI Werten) dargestellt. Mögliche Erklärung wäre, dass die gewählten Mäusestämme nicht das ideale Modell darstellen.

Eine koreanische Arbeitsgruppe führte eine Untersuchung mit einem anderen Mäusestamm, den AKR/1J-Mäusen durch. Mit der 2-DE wurden die Proteinmuster von Leberextrakten jüngeren Alters, 4 und 20 Wochen, sowie des höheren Alters, 50 Wochen, untersucht [154]. Hierbei zeigte der Mäusestamm SAMP8 die kürzere Lebensspanne von 42 Wochen und der SAMR1 Mäusestamm war die Kontrolle mit einer Lebensspanne von 62 Wochen. Die Untersuchung ergab 85 unterschiedlich veränderte Proteine. Hierbei waren in dem Mäusestamm mit kürzerer Lebensspanne antioxidativ wirkende Proteine, wie Glutathionperoxidase verstärkt, und das Peroxiredoxin und die Glutathiontransferase vermindert, exprimiert. Die erhöhte Proteinexpression der Glutathionperoxidase wurde durch die im Alter vermehrt auftretenden ROS erklärt. Eine Abnahme der Proteinexpression von Proteinen, die in die Signaltransduktion und Apoptose involviert sind, konnte bei den Mäusen mit kürzerer Lebensspanne festgestellt werden. Eine eindeutige Erklärung dazu konnte nicht gemacht werden.

Die eigene Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Lebensspannen gewählter Mausspezies, gibt einen Hinweis für den Zusammenhang der Änderung der Proteinexpression und dem „schnelleren Altern“ wieder.