

4. Ergebnisse

4.1 Zweidimensionale Großgelelektrophorese

Für die Proteomanalyse des Herzmuskels konnten mit der hochauflösenden, zweidimensionalen Großgelelektrophorese typische Proteinmuster für das Herzgewebe dargestellt werden (vgl. Abbildung 8).

Zunächst wird auf die Begriffserklärung in dem vorliegenden Dokument eingegangen. Folgende Begriffe wurden zur Bezeichnung und Erläuterung verwendet: **Proteinspots** entsprechen einzelnen Spots eines Proteinmusters; **Spotunterschiede** entsprechen Spots, die zwischen zwei zu vergleichenden Proteinmustern unterschiedlich sind; **Proteine** entsprechen Spots, die mit der Massenspektrometrie in ihrer Identität bestimmt wurden.

Bei der Auswertung der untersuchten Proteinmuster ging es um qualitative Spotunterschiede. Diese entsprechen Änderungen in der Spotintensität und im Spotvolumen (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden).

Die Anzahl der Proteinspots eines Proteinmusters wurde sowohl visuell als auch mit geeignetem Bildverarbeitungsprogramm erfasst. Die **visuelle** Auswertung ergab eine Anzahl von **ca. 3100 Proteinspots**. Dagegen ergab die **computergestützte** Analyse eine Anzahl von **ca. 3870 Proteinspots**. Der Unterschied in der visuellen und computergestützten Auswertung ist u.a. durch die begrenzte Erfassung an Graustufen des menschlichen Auges bedingt.

Die weitgehende Übereinstimmung von Position und Intensität der Proteinspots ermöglichte eine korrekte Auswertung der Proteinmuster. Hierbei wurden Spotunterschiede berücksichtigt, die in allen untersuchten Gelpaaren identisch waren. Die einzelnen Spotunterschiede wurden visuell und computergestützt ausgewertet. Anschließend erfolgte eine Identifizierung der Proteine mit der Massenspektrometrie.

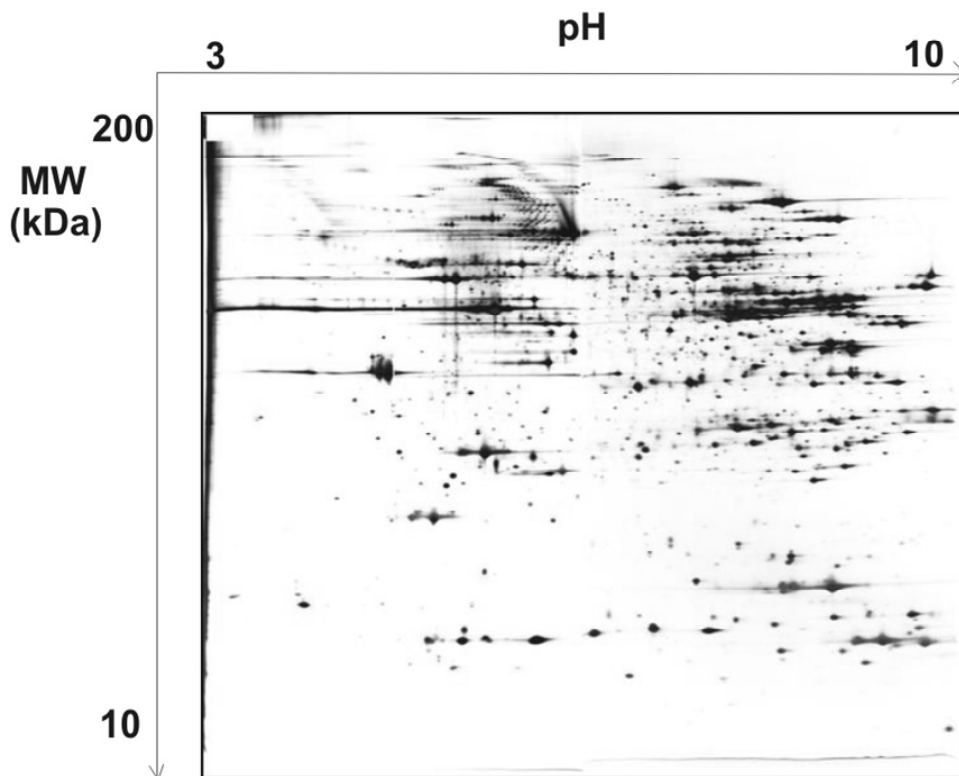


Abbildung 8: Proteinmuster des Herzgesamtextraktes.

4.2 Proteinexpression in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Lebensalter

Für die Charakterisierung der Proteinexpression in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und Alter, wurden Gesamtextrakte von Herzmuskelproben der C57BL/6-Maus untersucht. Die hierbei untersuchten Lebensphasen umfassen die Embryonalphase, Geburtsphase, Postnatalphase und Adultphase. Für jede Lebensphase wurden verschieden alte C57BL/6-Mäuse untersucht. Hierbei wurden für jedes untersuchte Alter drei Gelpaare bzw. Proteinexpressionsmuster mit der 2-DE dargestellt.

4.2.1 Charakterisierung der Proteinmuster in verschiedenen Entwicklungsphasen

Für eine aussagekräftige Auswertung der Proteinmuster wurden die untersuchten Herzmuskelproben unterschiedlichen Alters (Stadium) zu

einzelnen Lebensphasen gruppiert: **Embryonalphase** (ET 12, ET 14, ET 16, ET 18), **Geburtsphase** (ET 18, NG, 1 Wo), **Postnatalphase** (1 Wo, 2 Wo, 8 Wo) und die **Adultphase** (8 Wo, 14 Wo, 42 Wo, 100 Wo). Anschließend wurden die gesamten Proteinmuster des jeweiligen Alters verglichen und ausgewertet (vgl. Tabelle 1-4). Hierbei wurden die Proteinmuster des älteren Stadiums mit dem Proteinmuster des jüngeren Stadiums verglichen und Spotunterschiede festgehalten. Es erfolgte je nach Änderung der Intensität bzw. des Volumens der Proteinspots die charakteristische Zuordnung des Spotprofils (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden). Zu den hierbei ermittelten Spotunterschieden wurde der prozentuale Anteil, gemessen an der Gesamtspotzahl des Proteinmusters, errechnet (vgl. Tabelle 6). Zusätzlich ergab der Vergleich der Proteinmuster auffällige hoch- bzw. herunterregulierte Spotunterschiede für die Geburts- und Postnatalphase. Für die Geburtsphase konnte ein erhöhter Anteil an variablen Proteinspots mit hochreguliertem Spotprofil erfasst werden (vgl. Tabelle 2). Für die Postnatalphase dagegen ein erhöhter Anteil an variablen Proteinspots mit herunterreguliertem Spotprofil (vgl. Tabelle 3). Zur Darstellung dieses Sachverhaltes wurde eine Übersicht (vgl. Tabelle 5) sowie ein Diagramm (vgl. Abbildung 9) der hoch- und herunterregulierten Proteinspots für die einzelnen Lebensphasen erstellt.

Tabelle 1: Darstellung der Spotunterschiede der Embryonalphase

(Vergleich der gesamten Proteinmuster: ET 14 vs. ET 12; ET 16 vs. ET 14; ET 18 vs. ET 16).

Spotprofil	ET14/ET12	ET16/ET14	ET18/ET16			
Hochreguliert	11	5	1			
Herunterreguliert	2	5	5			
Vorhanden	-	-	3			
Nicht vorhanden	2	-	3			
Summe	15	10	12	→	37	Spots

Tabelle 2: Darstellung der Spotunterschiede der Geburtsphase

(Vergleich der gesamten Proteinmuster: NG vs. ET 18; 1 Wo vs. NG).

Spotprofil	NG/ET18	1Wo/NG				
Hochreguliert	62	6				
Herunterreguliert	9	9				
Vorhanden	3	2				
Nicht vorhanden	3	10				
Summe	77	27	→	104	Spots	

Tabelle 3: Darstellung der Spotunterschiede der Postnatalphase
 (Vergleich der gesamten Proteinmuster: 2 Wo vs. 1 Wo; 8 Wo vs. 2 Wo).

Spotprofil	2Wo/1Wo	8Wo/2Wo			
Hochreguliert	22	7			
Herunterreguliert	43	17			
Vorhanden	7	-			
Nicht vorhanden	2	3			
Summe	74	27	→	101	Spots

Tabelle 4: Darstellung der Spotunterschiede der Adultphase
 (Vergleich der gesamten Proteinmuster: 14 Wo vs. 8 Wo; 42 Wo vs. 14 Wo; 100 Wo vs. 42 Wo).

Spotprofil	14Wo/8Wo	42Wo/14Wo	100Wo/42Wo			
Hochreguliert	24	2	6			
Herunterreguliert	7	12	3			
Vorhanden	26	-	3			
Nicht vorhanden	1	1	1			
Summe	58	15	13	→	86	Spots

Tabelle 5: Darstellung der hoch- und herunterregulierten Proteinspots in der Entwicklung.

Angabe des prozentualen Anteils, gemessen an der Zahl der Spotunterschiede. EMP=Embryonalphase; GEP=Geburtsphase; POP=Postnatalphase; ADP=Adultphase. (Spots mit vorhandenem bzw. nicht vorhandenem Spotprofil sind nicht aufgeführt).

	EMP	GEP	POP	ADP
• Spotunterschiede (100%)	37	104	101	86
• Hochregulierte Spots prozentualer Anteil (%)	17 46	68 65,4	29 28,7	32 37,2
• Herunterregulierte Spots 22 prozentualer Anteil (%)		12 17,3	18 59,4	60 25,6

Verlauf der hoch- und herunterregulierten Proteinspots in der Entwicklung

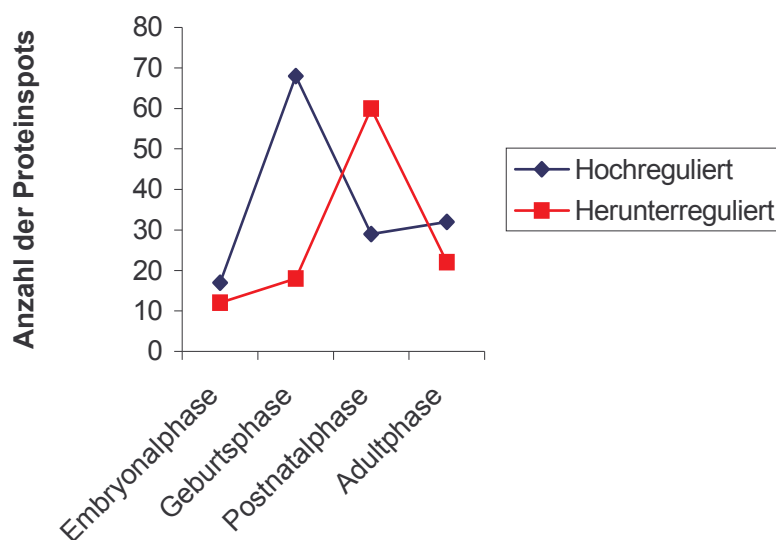


Abbildung 9: Darstellung der hoch- und herunterregulierten Proteinspots in der Entwicklung (alle Lebensphasen); Vergleiche Tabellen 1-4.

Tabelle 6: Anteil der Spotunterschiede der visuell bzw. computergestützt ermittelte Gesamtspotzahl in verschiedenen Entwicklungsphasen.
 EMP=Embryonalphase; GEP=Geburtsphase; POP=Postnatalphase; ADP=Adultphase.

	EMP	GEP	POP	ADP
• Spotunterschiede	37	104	101	86
•Prozentualer Anteil (%)				
Visuell (ca.3100 Spots)	1,2	3,4	3,3	2,8
•Prozentualer Anteil (%)				
Computergestützt (ca.3870 Spots)	1	2,7	2,6	2,2

Aus den Tabellen 1-4, 6 ist ersichtlich, dass die Spotunterschiede der untersuchten Lebensphasen in einem prozentualen Bereich von ca. 1-3 % liegen. Demnach ist die Häufigkeit der Proteinspots, die eine Änderung in ihrem Volumen und ihrer Intensität im Laufe der Entwicklung und des Alters aufweisen, sehr gering. Der prozentuale Anteil der Spotunterschiede in den untersuchten Lebensphasen ist in Tabelle 6 dargestellt. Da die Auswertung der Proteinmuster visuell erfolgte, wurde die visuell ermittelte Gesamtspotzahl als Bezug für die Bestimmung von prozentualen Anteilen genommen. Die computergestützt ermittelte Gesamtspotzahl diente in der Tabelle 6 als Vergleich. Die Geburtsphase (GEP), die Postnatalphase (POP) und die Adultphase (ADP) zeigen mit ca. 3 % die häufigsten Spotunterschiede. Die Embryonalphase zeigt mit ca. 1 % die geringsten Spotunterschiede. Die Spotunterschiede der GEP und POP waren in ihrem hoch- und herunterregulierten Spotprofil auffällig. Die Tabelle 5 und die Abbildung 9 zeigen, dass von den 104 Spotunterschieden der GEP 68 Spots (65,4 %) ein hochreguliertes Spotprofil aufweisen, d.h. die Proteinexpression verstärkt war. In der POP zeigten sich 101 Spotunterschiede. Von diesen zeigten 60 Spots (59,4 %) ein herunterreguliertes Spotprofil, was auf eine reduzierte Proteinexpression schließen lässt. Die erhöhte Expression von Proteinen in der

Geburtsphase dürfte mit der Anpassung beim Übergang vom intra- zum extrauterinen Leben zusammenhängen. Im Postnatalstadium ist dieser Vorgang weitgehend abgeschlossen, so dass es zu einer reduzierten Proteinexpression kommt. Während der Embryonalentwicklung unterliegt der Embryo der maternalen Versorgung und zeigt eine nahezu konstante Proteinexpression. In der Adultphase (ADP) ist eine geringfügig abnehmende Häufigkeit der Spotunterschiede sichtbar. Im adulten Lebensstadium des Menschen wirken sich Umwelteinflüsse (Ernährung, Stress, Wohlbefinden...) und der allgemeine Gesundheitszustand stärker auf die Proteinexpression aus (vgl. Kapitel 5.1).

4.2.1.1. Massenspektrometrische Identifizierung der Spotunterschiede des Herzmuskels in der Entwicklung und Alterung

Im Kapitel 4.2.1 wurde festgestellt, dass die Zahl der Spotunterschiede des Herzmuskels in der Entwicklung zwischen ca. 1-3 % liegt. Daran anknüpfend wurden diese variablen Proteinspots in ihrer Identität mit der Massenspektrometrie (MS) analysiert und in ihrer Funktion charakterisiert.

Um die Altersabhängigkeit der Proteinexpression aussagekräftiger darzustellen wurden die variablen Proteinspots der Adultphase (8 Wochen-100 Wochen) und der Geburtsphase (ET 18-1 Woche) in ihrer Proteinidentität bestimmt. Anschließend erfolgte das Recherchieren mittels Datenbanken der Proteinfunktion der hierbei identifizierten Proteine. Letzlich wurden die identifizierten Proteine beider Lebensphasen gegeneinander verglichen und dargestellt.

In der Geburtsphase wurden insgesamt 104 Spotunterschiede ermittelt (vgl. Kapitel 4.2.1). Dies entspricht einer Zahl von 84 Proteinspots. Davon wurde für 49 Spots (58 %) die Proteinidentität durch MS bestimmt (vgl. Tabelle 1 im Anhang). Die Erklärung für die reduzierte Zahl an Proteinspots im Vergleich zu der Zahl an Spotunterschieden ist folgende: Für alle Lebensphasen wurden Proteinmuster unterschiedlichen Alters ausgewertet. Für die Erfassung der Spotunterschiede der jeweiligen Lebensphasen, wurden die Spotunterschiede aller verglichenen Proteinmuster ausgewertet. Da einzelne Proteinspots

mehrfach verändert sind (mehrere Altersvergleiche) führt dies zu einer Erhöhung der Zahl an Spotunterschieden für die einzelnen Lebensphasen.

In der Adultphase (ADP) konnten insgesamt 86 Spotunterschiede ermittelt werden. Dies entspricht einer Zahl von 75 Proteinspots. Mit der Massenspektrometrie konnten für die ADP 43 Spots (57 %) in ihrer Proteinidentität bestimmt werden (vgl. Tabelle 2 im Anhang). Anschließend wurden die identifizierten Proteine, für die jeweilige Lebensphase, in Proteinfunktionsklassen (Datenbankrecherche) gruppiert (vgl. Tabelle 7). In der Tabelle 8 sind die Proteine dargestellt, die sowohl in der ADP als auch in der GEP identifiziert wurden. Für jedes identifizierte Protein wurde die Zahl der Proteinspots, die diesem entsprechen angegeben.

Tabelle 7: Funktionelle Zuordnung der in der Adultphase (ADP) und Geburtsphase (GDP) durch MS identifizierten Proteine unter Angabe der jeweiligen Anzahl an Proteinspots

(zu beachten ist, dass einzelne Proteinspots u.U. ein Proteingemisch darstellen können).

Proteinklassen	GEP	ADP
Energie/Metabolismus	16	8
Zytoskelett/Strukturproteine	7	8
Transport	6	4
Signaltransduktion	5	6
Sonstige	5	9
Keine Zuordnung	11	8

Tabelle 8: Zuordnung der Proteine, die in der Adultphase (ADP) und Geburtsphase (GDP) durch MS identifiziert wurden.

Angabe der Zahl der einzelnen Proteinspots sowie deren Summe.

Protein	Proteinklasse	Spots	
		GEP	ADP
•Troponin 2	Zytoskelett/Strukturprotein	2	2
• α -Actin	Zytoskelett/Strukturprotein	2	2
•Tropomyosin 4	Zytoskelett/Strukturprotein	1	2
•Tyrosin-3-monooxygenase	Signaltransduktion	1	1
•Prohibitin	Signaltransduktion	2	3
• α -1-Globin	Transport	2	1
•Peroxisom-oxidation 2	Energie/Metabolismus	5	1
•Ubiquinol-cytochrom c-Reduktase	Energie/Metabolismus	1	1
•Cytochrom c-Oxidase	Energie/Metabolismus	1	1
Summe der Proteinspots		17	14
Zahl der insgesamt identifizierten Proteinspots		49	43

Die Tabellen (vgl. 1 und 2 im Anhang) präsentieren eine Übersicht der identifizierten Proteine, die als variable Proteinspots für die Geburts- und Adultphase erfasst wurden. Die identifizierten Proteine der ADP waren nahezu gleichmäßig auf die einzelnen Proteinklassen verteilt (vgl. Tabelle 7). Bei den identifizierten Proteinen der Geburtsphase war auffällig, dass 16 Proteinspots dem Bereich des Energie und Metabolismus zugeordnet werden konnten. In der ADP ließen sich dagegen zur Gruppe Energie und Metabolismus acht Proteinspots zuordnen. Neun identifizierte Proteine waren in der Geburts- und Adultphase identisch (vgl. Tabelle 8). Von diesen waren je drei Proteine aus dem Funktionsbereich Energie und Metabolismus bzw. Zytoskelett/Strukturproteine. Zwei der Proteine sind an die Prozesse der Signaltransduktion gebunden. Ein Protein ist der Proteinklasse der Transporter zuzuordnen. Diese neun identischen Proteine sind in der Geburtsphase als 17 Proteinspots, in der Adultphase in Form von 14 Proteinspots vertreten. Von den in der Geburtsphase identifizierten 49 Proteinspots unterscheiden sich somit 32

von den Proteinspots der Adultphase und von den 43 identifizierten Proteinspots der Adultphase unterscheiden sich 29 von den Proteinspots der Geburtsphase (vgl. Tabelle 8). Demnach ist der größte Teil der identifizierten Proteinspots für die Geburts- und Adultphase unterschiedlich.

4.2.2 Altersabhängige Variation der Proteinspots des Herzmuskels

In einem weiteren Schritt wurden **Proteinspots** erfasst, **die ein altersabhängiges Spotprofil in den Entwicklungsphasen aufweisen**.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der altersabhängig variablen Proteinspots in ihrer Gesamtheit (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Hierzu wurden, wie erwähnt, die Proteinmuster folgenden Alters verglichen: 100 Wo vs. 42 Wo; 42 Wo vs. 14 Wo; 14 Wo vs. 8 Wo; 8 Wo vs. 2 Wo; 2 Wo vs. 1 Wo; 1 Wo vs. NG; NG vs. ET 18; ET 18 vs. ET 16; ET 16 vs. ET 14; ET 14 vs. ET 12. Anschließend wurden die hierbei ermittelten Spotunterschiede gegeneinander verglichen. Altersabhängige Proteinspots mussten in mindestens zwei Lebensstadien ein unterschiedliches Spotprofil aufweisen. Zur Darstellung wurden die altersabhängigen Proteinspots in einem als Mastergel dienenden Proteinmuster (vgl. Abbildung 10) markiert.

Darüber hinaus wurden sieben Beispiele repräsentativer, altersabhängig variabler Proteinspots als Bildausschnitte in ihrem Spotprofil über die untersuchten Lebensphasen dargestellt (vgl. 4.2.2.3). Außerdem erfolgte eine graphische Darstellung der Spotprofile der sieben altersabhängig variablen Proteinspots. Die dafür notwendigen rechnerischen Daten wurden mit der computergestützten Auswertung erzielt. Hierbei wurde für die repräsentativen, altersabhängig variablen Proteinspots die Spotintensität für jedes untersuchte Alter bestimmt. Weiterhin wurde mit der Massenspektrometrie die Proteinidentität dieser repräsentativen, altersabhängigen Proteinspots analysiert.

4.2.2.1 Grundlegende Darstellungen der altersabhängigen Proteinspots in den untersuchten Entwicklungsphasen

Wie beschrieben, wurden die **altersabhängig variablen Proteinspots** für die untersuchten Proteinmuster einzelner Lebensphasen bestimmt (vgl. Tabelle 9) und in einem Proteinmuster dargestellt (vgl. Abbildung 10). Erfasst wurden Proteinspots, die **in mindestens zwei Lebensstadien verändert** waren. Für jeden so ermittelten altersabhängigen Proteinspot wurden in der Tabelle 9 das Alter und die Lebensphase der Änderung des Spotprofils angegeben. Weiterhin wurde in der Tabelle 11 der Anteil der visuell festgestellten altersabhängigen Proteinspots an der Gesamtspotzahl des Proteinmusters errechnet. Diese Daten geben einen Überblick über die Häufigkeit von altersabhängigen Proteinspots im Verlauf der Entwicklung und Alterung.



Abbildung 10: Darstellung der altersabhängig variablen Proteinspots des Hermuskels im Proteinmuster. Die einzelnen Proteinspots wurden durch einen rot markierten Kreis gekennzeichnet und durchnummeriert.

Tabelle 9: Darstellung der altersabhängig variablen Proteinspots (durchnummeriert).

Angabe des Alters und der Lebensphase, in dem die Änderung des Spotprofils festgestellt wurde. Hervorgehobene Spotnummern entsprechen den sieben repräsentativen Beispielen altersabhängig variabler Proteinspots, die im folgenden Kapitel in ihrem Spotprofil dargestellt werden. A= Adultphase, P= Postnatalphase, G= Geburtsphase, E= Embryonalphase.

Spotnummer	Lebensphase	Alter der Änderung des Spotprofils
1	A, P	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo
2	A, P	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo
3	A, P	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo
4	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
5	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
6	A, P, G	14Wo/8Wo; 2Wo/1Wo; 1Wo/NG
7	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
8	A, G, E	42Wo/14Wo; 1Wo/NG; ET18/ET16
9	A, P	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo
10	A, P	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo
11	A	42Wo/14Wo; 14Wo/8Wo
12	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
13	P	8Wo/2Wo; 2Wo/1Wo
14	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
15	A, G, E	42Wo/14Wo; 1Wo/NG; ET16/ET14
16	A, P, G, E	42Wo/14Wo; 2Wo/1Wo; 1Wo/NG; NG/ET18; ET18/ET16; ET16/ET14
17	A, P, E	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo; 2Wo/1Wo; ET14/ET12
18	A, P, G, E	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo; 2Wo/1Wo; ET16/ET14
19	A, P, G	42Wo/14Wo; 14Wo/8Wo; 2Wo/1Wo; 1Wo/NG
20	A, P, E	14Wo/8Wo; 2Wo/1Wo; ET16/ET14
21	A, P	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo
22	P, G	8Wo/2Wo; 2Wo/1Wo; 1Wo/NG
23	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
24	A, P	14Wo/8Wo; 8Wo/2Wo
25	P, G	8Wo/2Wo; 2Wo/1Wo; 1Wo/NG
26	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
27	P, G	2Wo/1Wo; 1Wo/NG
28	E	ET18/ET16; ET16/ET14

Tabelle 10: Prozentualer Anteil der altersabhängig variablen Proteinspots gemessen an der Gesamtspotzahl des Proteinmusters.

Altersabhängig variable Proteinspots	Gesamtspotzahl im Proteinmuster	Prozentualer Anteil
28 Spots	visuell: 3100 Spots	0,9 %

Die Abbildung 10 gibt die 28 Proteinspots mit altersabhängig variablem Spotprofil wieder. Diese altersabhängig variablen Proteinspots zeigen Änderungen in ihrem Spotprofil in mindestens zwei Lebensstadien (vgl. Tabelle 9). Die 28 altersabhängigen Proteinspots sind in ihrer Lokalisation in allen Arealen des Proteinmusters des Herzmuskels anzutreffen. Der prozentuale Anteil der altersabhängigen Proteinspots gemessen an der Gesamtspotzahl des Proteinmusters liegt bei 0,9 % (vgl. Tabelle 10; Auswertung erfolgte visuell). Daher kann ihre Häufigkeit in der Entwicklung und Alterung als sehr gering angesehen werden.

4.2.2.2 Detaillierte Darstellungen der altersabhängigen Proteinspots in den untersuchten Entwicklungsphasen

In diesem Kapitel werden die **altersabhängig variablen Proteinspots** näher charakterisiert. Hierzu gehören die Proteinspots, die in den mindestens zwei untersuchten Lebensstadien verändert waren. Diese Proteinspots entsprechen den zuvor ermittelten Spotunterschieden (vgl. Kapitel 4.2.2.1) der jeweiligen Embryonalphase, Geburtsphase, Postnatalphase und Adultphase, die in einem weiteren Schritt gegeneinander verglichen wurden, um so ihre **mehrfache Änderung des Spotprofils in weiteren Stadien** zu ermitteln (vgl. Tabellen 11-13). Die dabei ausgewerteten Proteinspots entsprechen altersabhängig variablen Proteinspots. Die für jedes Alter ermittelten Spotunterschiede mussten in ihrem Spotprofil nicht identisch verändert sein, sondern sollten ausschließlich eine Änderung, unabhängig vom Spotprofil, in mehreren Lebensstadien aufweisen.

Die Charakterisierung der altersabhängig variablen Proteinspots umfasst die Angabe des Spotprofils und des Lebensstadiums, in dem die Änderung erfolgte (vgl. Tabelle 14-19). Weiterhin wurde der prozentuale Anteil der altersabhängigen Proteinspots errechnet.

Tabelle 11: Darstellung der altersabhängig variablen Proteinspots

(der Geburtsphase im Vergleich mit den weiteren Entwicklungs- und Altersphasen; EMP= Embryonalsphase; POP= Postnatalphase; ADP= Adultphase). Angabe der variablen Proteinspots pro Entwicklungs- und Altersphase (vgl. Kapitel 4.2.2).

Anzahl variabler Spots	Untersuchte Entwicklungs- und Altersphasen			
	GEP	EMP	POP	ADP
Pro Entwicklungs- und Altersphase	104	37	101	86
Anzahl variabler Spots: Der Geburtsphase , die ebenfalls in den weiteren Entwicklungs- und Altersphasen auftraten	104 (100%)	3 (2,9%)	15 (14,4%)	8 (7,7%)

Tabelle 12: Darstellung der altersabhängig variablen Proteinspots

(der Embryonalphase im Vergleich mit den weiteren Entwicklungs- und Altersphasen; EMP= Embryonalphase; POP= Postnatalphase; ADP= Adultphase). Angabe der variablen Proteinspots pro Entwicklungs- und Altersphase (vgl. Kapitel 4.2.2).

	Untersuchte Entwicklungs- und Altersphasen		
Anzahl variabler Spots	EMP	POP	ADP
Pro Entwicklungs- und Altersphase	37	101	86
Anzahl variabler Spots: Der Embryonalphase , die ebenfalls in den weiteren Entwicklungs- und Altersphasen auftraten	37 (100%)	13 (35,1%)	3 (8,1%)

Tabelle 13: Darstellung der altersabhängig variablen Proteinspots

(der Postnatalphase im Vergleich mit den weiteren Entwicklungs- und Altersphasen; POP= Postnatalphase; ADP= Adultphase). Angabe der variablen Proteinspots pro Entwicklungs- und Altersphase (vgl. Kapitel 4.2.2).

	Untersuchte Entwicklungs- und Altersphasen	
Anzahl variabler Spots	POP	ADP
Pro Entwicklungs- und Altersphase	101	86
Anzahl variabler Spots: Der Postnatalphase , die ebenfalls in den weiteren Entwicklungs- und Altersphasen auftraten	101 (100%)	18 (17,8%)

Tabelle 14: Darstellung des Spotprofils der altersabhängig variablen Proteinspots (Geburtsphase vs. Embryonalphase).

Altersabhängig variable Spots (gesamt): 3 Spots

Anzahl variabler Spots	Spotprofil Geburtsphase	Spotprofil Embryonalphase
3	Hochreguliert	Hochreguliert

Tabelle 15: Darstellung des Spotprofils der altersabhängig variablen Proteinspots (Geburtsphase vs. Postnatalphase).

Altersabhängig variable Spots (gesamt): 15 Spots

Anzahl variabler Spots	Spotprofil Geburtsphase	Spotprofil Postnatalphase
6	Hochreguliert	Hochreguliert
2	Herunterreguliert	Herunterreguliert
7	Hochreguliert	Herunterreguliert

Tabelle 16: Darstellung des Spotprofils der altersabhängig variablen Proteinspots (Geburtsphase vs. Adultphase).

Altersabhängig variable Spots (gesamt): 8 Spots

Anzahl variabler Spots	Spotprofil Geburtsphase	Spotprofil Adultphase
2	Hochreguliert	Hochreguliert
6	Herunterreguliert	Herunterreguliert

Tabelle 17: Darstellung des Spotprofils der altersabhängig variablen Proteinspots (Embryonalphase vs. Postnatalphase).

Altersabhängig variable Spots (gesamt): 13 Spots

Anzahl variabler Spots	Spotprofil Embryonalphase	Spotprofil Postnatalphase
5	Hochreguliert	Hochreguliert
4	Herunterreguliert	Herunterreguliert
2	Hochreguliert	Herunterreguliert
1	Herunterreguliert	Nicht vorhanden
1	Hochreguliert	Nicht vorhanden

Tabelle 18: Darstellung des Spotprofils der altersabhängig variablen Proteinspots (Embryonalphase vs. Adultphase).

Altersabhängig variable Spots (gesamt): 3 Spots

Anzahl variabler Spots	Spotprofil Embryonalphase	Spotprofil Adultphase
2	Hochreguliert	Hochreguliert
1	Hochreguliert	Herunterreguliert

Tabelle 19: Darstellung des Spotprofils der altersabhängig variablen Proteinspots (Postnatalphase vs. Adultphase).

Altersabhängig variable Spots (gesamt): 18 Spots

Anzahl variabler Spots	Spotprofil Postnatalphase	Spotprofil Adultphase
6	Hochreguliert	Hochreguliert
3	Herunterreguliert	Herunterreguliert
1	Hochreguliert	Herunterreguliert
1	Herunterreguliert	Hochreguliert
3	Nicht vorhanden	Vorhanden
1	Vorhanden	Nicht vorhanden
2	Vorhanden	Hochreguliert
1	Hochreguliert	Nicht vorhanden

Die altersabhängig variablen Proteinspots der jeweiligen Lebensphasen wurden in den Tabellen 11-13 festgehalten. Sie entsprechen den Proteinspots, die in mehreren Lebensstadien in ihrem Spotprofil verändert sind. Die altersabhängigen Proteinspots sind mit einer Anzahl von 3-18 Proteinspots (je nach Lebensphase) vertreten. Das Ergebnis zeigt, dass sich identische Proteinspots in mehreren Stadien verändern und somit altersabhängig variabel sind. Die Angaben in den Tabellen 14-19 belegen weiterhin, dass diese altersabhängigen Proteinspots in ihrem Spotprofil über die Entwicklungsphasen sowohl identisch als auch unterschiedlich sein können.

4.2.2.3 Spotprofile altersabhängiger Proteinspots über die Entwicklungsphasen

In diesem Kapitel werden die Spotprofile der altersabhängig variablen Proteinspots in den Entwicklungsphasen charakterisiert. Zur Darstellung dienen sieben Beispiele repräsentativer, altersabhängig variabler Proteinspots, die unter 4.2.2.1 aufgeführt sind. Die Spotprofile dieser Proteinspots werden als Bildausschnitte und Graphiken (rechnerische Daten) dargestellt. Es handelte sich dabei um die in der Tabelle 9 markierten Proteinspots: Spotnummer 8, Spotnummern 15-20. Die Bildausschnitte präsentieren den betreffenden altersabhängigen Proteinspot in den untersuchten Entwicklungsphasen. Für die graphische Darstellung der altersabhängig variablen Proteinspots erfolgte zunächst eine Umsetzung der Bildinformation der silbergefärbten Proteinmuster in rechnerische Daten. Die mit dem Bildverarbeitungsprogramm ermittelten Spotintensitäten sind abhängig von der Schwärzung der Proteinspots, welche durch die Silberfärbung zustande kam. Die Spotintensitäten jedes altersabhängigen Proteinspots wurden aus allen drei Gelpaaren errechnet und im Diagramm erfasst. Aus den einzelnen Spotintensitäten wurde dann das arithmetische Mittel gebildet und die resultierenden durchschnittlichen Spotintensitäten zusätzlich aufgeführt und als Trendlinie dargestellt. Auf der Abszisse ist das Alter dargestellt. Hierbei wurde die Achse in drei Zeitintervalle aufgeteilt. Die Zeitintervalle sind durch eine Markierung mit einem Doppelstrich gekennzeichnet. Der Grund für die dreifache Teilung sind die weit

auseinanderliegenden Zeitpunkte, die eine Überlagerung einzelner Werte zur Folge hätte, und somit das Spotprofil nicht deutlich dargestellt wäre. Die Ordinate präsentiert die Spotintensitäten der altersabhängig variablen Proteinspots.

Altersabhängig variabler Proteinspot: Spotnummer 8

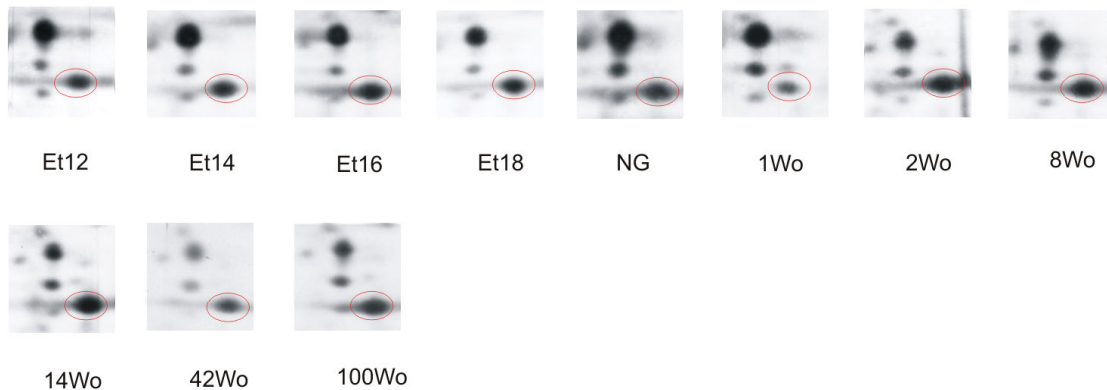


Abbildung 11: Bildliche Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 8 über die untersuchten Stadien.

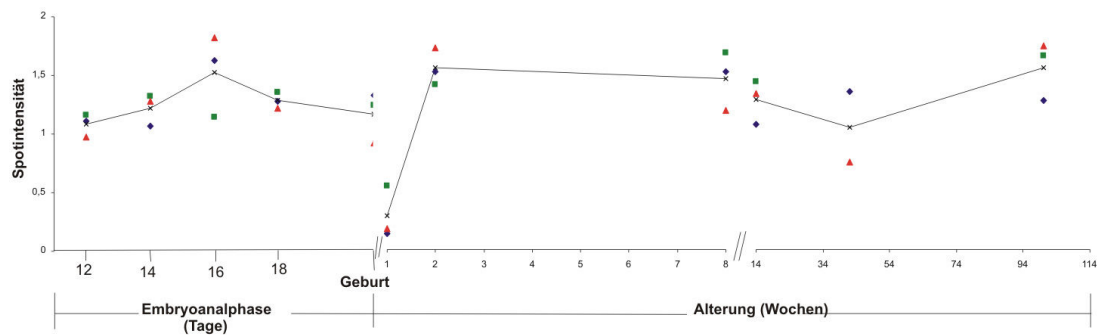


Abbildung 12: Graphische Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 8.

Tabelle 20: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des Proteinspots Nummer 8.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	1,108	1,163	0,972	1,081
ET14	1,065	1,321	1,277	1,221
ET16	1,625	1,142	1,819	1,529
ET18	1,281	1,354	1,222	1,286
NG	1,329	1,250	0,924	1,168
1Wo	0,138	0,559	0,184	0,294
2Wo	1,560	1,451	1,771	1,594
8Wo	1,561	1,730	1,223	1,505
14Wo	1,098	1,477	1,373	1,316
42Wo	1,387	n.a. ^[a]	0,77	1,079
100Wo	1,311	1,701	1,787	1,56

^[a] nicht auswertbar.

Der altersabhängig variable Proteinspot, als Spotnummer 8 bezeichnet, ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 11,12; Tabelle 20). Dieser wurde als Tyrosine 3-monoxygenase; Adaptermolekül; MW: 28 kDa; pI: 4,8 identifiziert. Die Spotintensität des altersabhängig variablen Proteinspots ist in den untersuchten Zeitpunkten nahezu konstant. Änderungen zeigen sich innerhalb der Embryonalphase zum Zeitpunkt ET16. Hierbei steigt die Spotintensität von ca. 1,2 (ET14) auf ca. 1,5 (ET16). In der Postnatalphase zeigt sich ein vierfaches Absinken der Spotintensität (von ca. 1,2 auf ca. 0,3) zum Zeitpunkt der 1. Woche. Die Adultphase zeigt einen nahezu konstanten Verlauf.

Altersabhängig variabler Proteinspot: Spotnummer 15

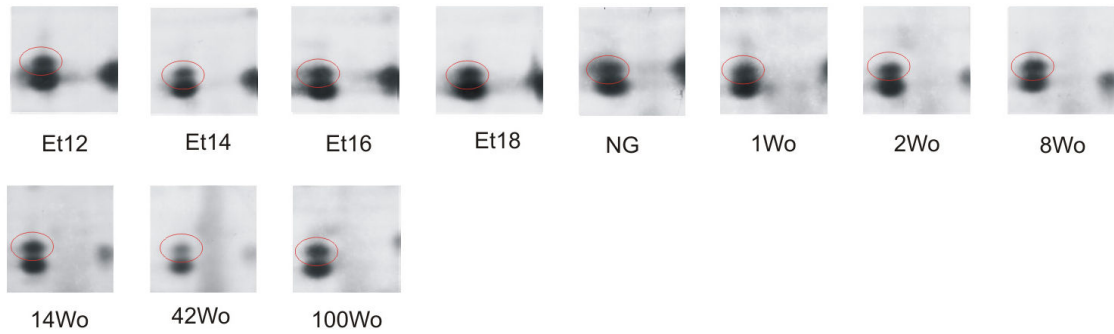


Abbildung 13: Bildliche Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 15 über die untersuchten Stadien.

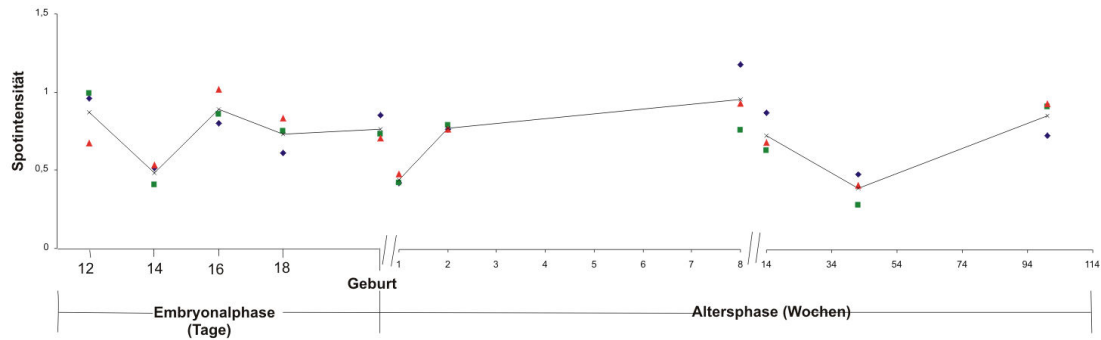


Abbildung 14: Graphische Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 15.

Tabelle 21: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des Proteinspots Nummer 15.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	0,958	0,99	0,671	0,873
ET14	0,512	0,408	0,533	0,484
ET16	0,801	0,855	1,018	0,891
ET18	0,607	0,747	0,831	0,728
NG	0,853	0,730	0,708	0,764
1Wo	0,437	0,441	0,496	0,458
2Wo	0,79	0,819	0,791	0,8
8Wo	1,219	0,785	0,963	0,989
14Wo	0,901	0,653	0,705	0,753
42Wo	0,499	0,294	0,425	0,406
100Wo	0,751	0,946	0,962	0,886

Der altersabhängig variable Proteinspot, als Spotnummer 15 bezeichnet, ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 13, 14; Tabelle 21). Dieser wurde als Rho GDP Dissoziationsinhibitor alpha, Signaltransduktion; MW: 23 kDa; pI: 5,2 identifiziert. In der Embryonalphase ist ein Absinken der Spotintensität zum Zeitpunkt ET14 zu beobachten. Die Spotintensität sinkt von ca. 0,9 (ET12) auf ca. 0,5 (ET14). Auch nach dem Zeitpunkt der Geburt ist ein ähnlicher Sachverhalt zu beobachten. Zum Zeitpunkt der 1. Woche ist der Wert der Spotintensität bei ca. 0,5. In den darauffolgenden Zeitpunkten erhöht sich diese auf ca. 0,9. In der Adultphase ist zum Zeitpunkt der 42. Woche ein Absinken der Spotintensität von ca. 0,8 (14Wo) auf 0,4 (42 Wo) und ein Anstieg in der 100.Woche auf ca.0,9 zu beobachten.

Altersabhängig variabler Proteinspot: Spotnummer 16

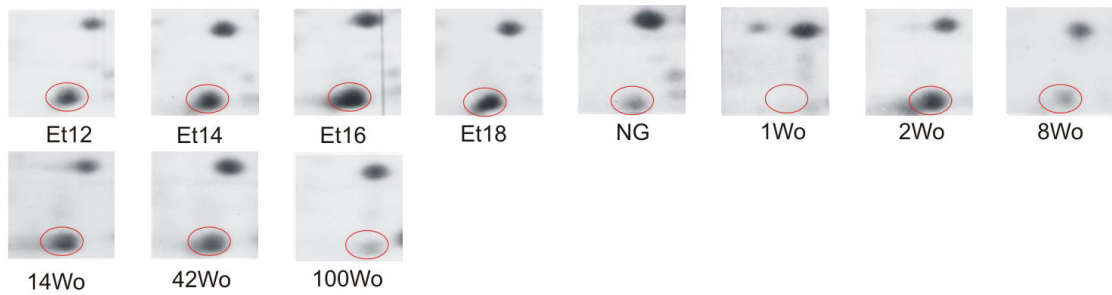


Abbildung 15: Bildliche Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 16 über die untersuchten Stadien.

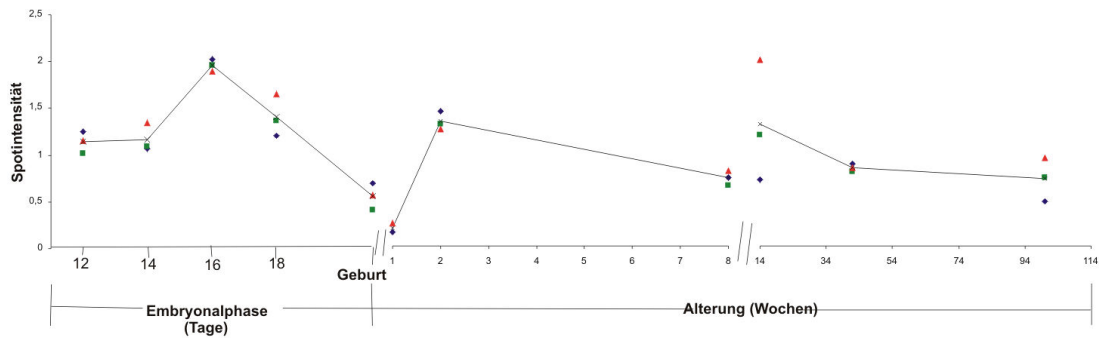


Abbildung 16: Graphische Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 16.

Tabelle 22: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des Proteinspots Nummer 16.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	1,249	1,022	1,155	1,142
ET14	1,070	1,086	1,342	1,166
ET16	2,019	1,957	1,892	1,956
ET18	1,211	1,371	1,651	1,411
NG	0,704	0,408	0,567	0,56
1Wo	0,156	n.a. ^[a]	0,247	0,202
2Wo	1,483	1,346	1,283	1,371
8Wo	0,748	0,671	0,834	0,751
14Wo	0,736	1,225	2,053	1,338
42Wo	0,909	0,816	0,861	0,862
100Wo	0,494	0,756	0,976	0,742

^[a] nicht auswertbar.

Der altersabhängig variable Proteinspot, als Spotnummer 16 bezeichnet, ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 15,16; Tabelle 22). Dieser wurde als Heat shock protein 27, Chaperone; MW: 23 kDa; pI: 6,12 identifiziert. Das Spotprofil variiert in den untersuchten Lebensstadien. Eine erhöhte Änderung der Spotintensität ist zu dem Zeitpunkt ET16 auffällig. In den darauffolgenden Zeitpunkten bis einschließlich der 1. Woche ist dagegen ein deutliches Absinken der Spotintensität ersichtlich. Der Wert der Spotintensität sinkt dabei von ca. 2 (ET16) auf einen Wert von 0,2 (1Wo). In der Adultphase ist zum Zeitpunkt der 14. Woche ein erneutes Ansteigen der Spotintensität auf einen Wert von ca. 1,3 zu beobachten. In den darauffolgenden Zeitpunkten sinkt diese auf einen Spotintensitätswert von ca. 0,8 ab und zeigt geringfügige Änderungen.

Altersabhängig variabler Proteinspot: Spotnummer 17

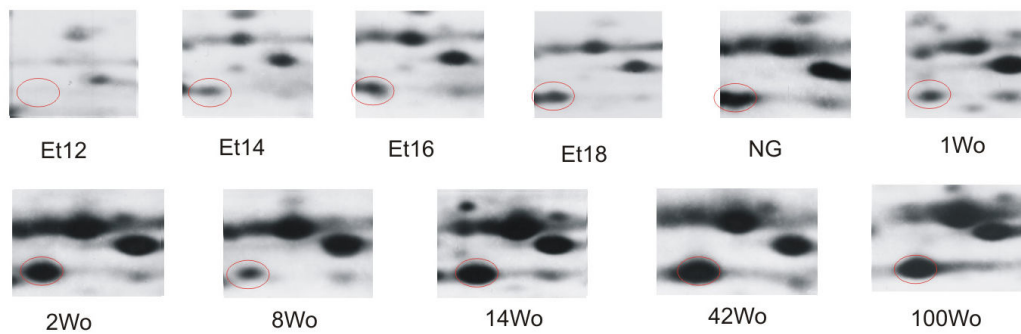


Abbildung 17: Bildliche Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 17 über die untersuchten Stadien.

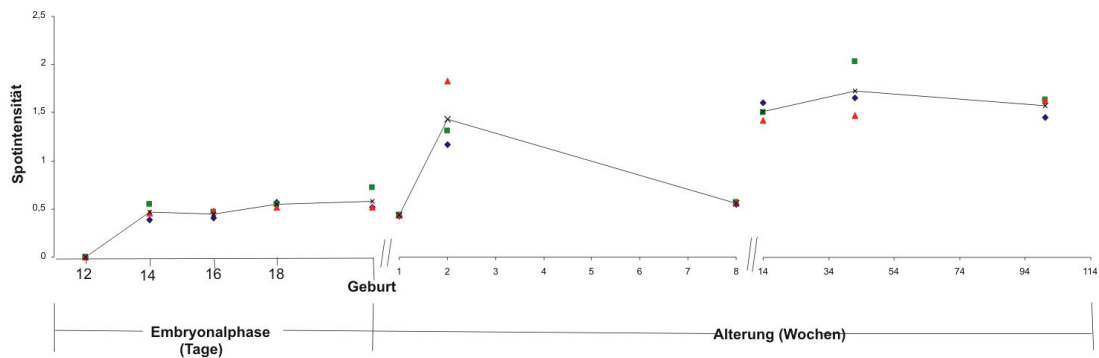


Abbildung 18: Graphische Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 17.

Tabelle 23: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des Proteinspots Nummer 17.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	n.v. ^[a]	n.v. ^[a]	n.v. ^[a]	n.v. ^[a]
ET14	0,388	0,545	0,461	0,465
ET16	0,410	0,465	0,474	0,45
ET18	0,566	0,547	0,519	0,544
NG	0,518	0,717	0,517	0,584
1Wo	0,443	0,447	0,448	0,446
2Wo	1,2	1,35	1,879	1,476
8Wo	0,563	0,584	0,586	0,578
14Wo	1,656	1,55	1,464	1,557
42Wo	1,705	2,095	1,521	1,774
100Wo	1,499	1,687	1,67	1,619

^[a] nicht vorhanden.

Der altersabhängig variable Proteinspot, als Spotnummer 17 bezeichnet, ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 19, 20; Tabelle 23). Dieser wurde als Proteasome subunit alpha type 7, Proteinsynthese, MW: 28 kDa; pI: 8,59 identifiziert. In der Embryonalphase ist dieser Proteinspot zum Zeitpunkt ET12 nicht present und zeigt sich dann zum Zeitpunkt ET14 mit einer Spotintensität von ca. 0,5. Anschließend ist dieser Proteinspot bis einschließlich der Postnatalphase mit einer Intensität von ca. 0,5 zu beobachten. Innerhalb der POP ist zum Zeitpunkt der 2. Woche ein dreifacher Anstieg der Spotintensität auf einen Wert von ca. 1,5 auffällig. Die Adultphase weist Spotintensitäten von ca. 1,6-1,8 auf. In dieser ist der altersabhängig variable Proteinspot in seiner Spotintensität am höchsten vertreten.

Altersabhängig variabler Proteinspot: Spotnummer 18

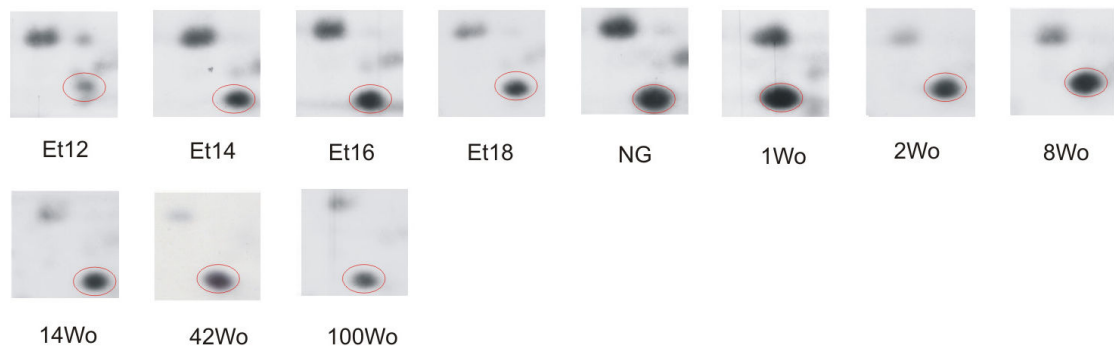


Abbildung 19: Bildliche Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 18 über die untersuchten Stadien.

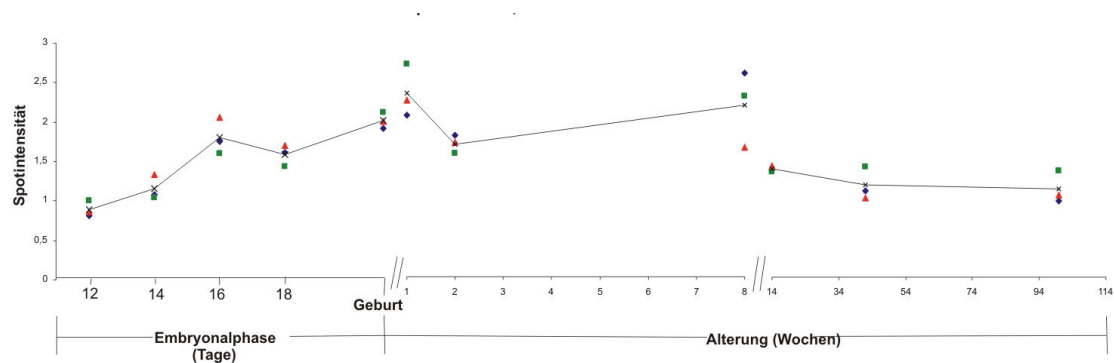


Abbildung 20: Graphische Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 18.

Tabelle 24: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des Proteinspots Nummer 18.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	0,813	1,004	0,869	0,895
ET14	1,084	1,041	1,334	1,153
ET16	1,756	1,6	2,057	1,804
ET18	1,609	1,439	1,709	1,586
NG	1,923	2,129	2,006	2,019
1Wo	2,113	2,781	2,307	2,400
2Wo	1,843	1,613	1,749	1,735
8Wo	2,660	2,357	1,69	2,236
14Wo	1,403	1,38	1,453	1,412
42Wo	1,128	1,443	1,032	1,201
100Wo	0,992	1,39	1,069	1,150

Der altersabhängig variable Proteinspot als Spotnummer 18 bezeichnet ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 21, 22; Tabelle 24). Dieser wurde als Peroxiredoxin 2, Peroxidase; MW: 22 kDa; pI: 5,2 identifiziert. Hierbei ist ein stetiger Anstieg der Spotintensität in der Embryonalphase bis einschließlich der Postnatalphase deutlich. Dabei steigt die Spotintensität in ihrem Wert von ca. 0,9 (ET12) auf ca. 2,2 (8Wo). In der darauffolgenden Adultphase erfolgt eine Reduktion der Spotintensität auf einen Wertebereich von ca. 1-1,4.

Altersabhängig variabler Proteinspot: Spotnummer 19

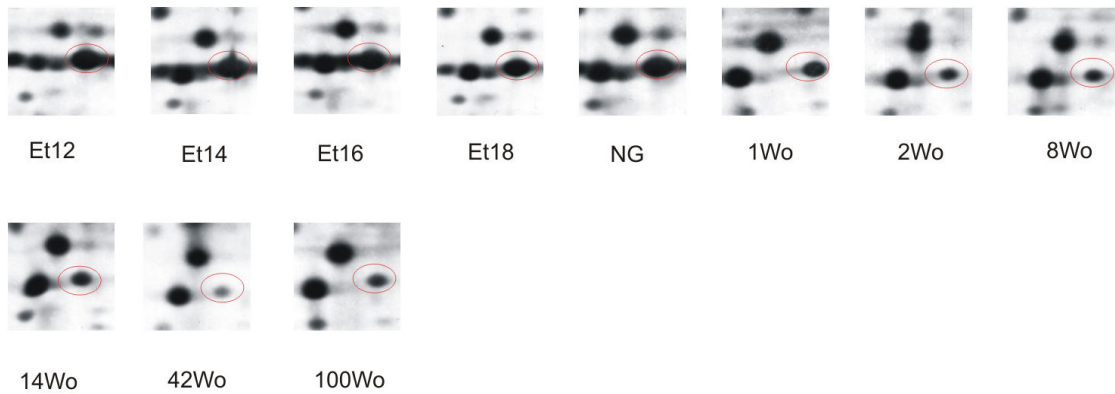


Abbildung 21: Bildliche Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 19 über die untersuchten Stadien.

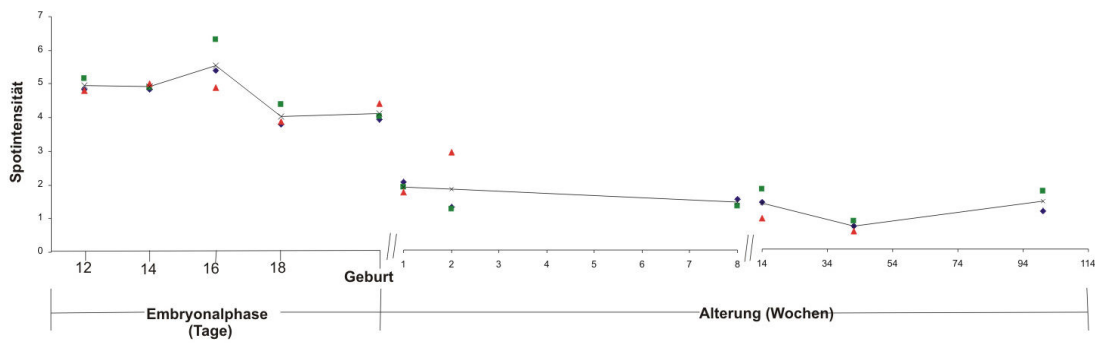


Abbildung 22: Graphische Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 19.

Tabelle 25: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des Proteinspots Nummer 19.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	4,834	5,168	4,819	4,940
ET14	4,842	4,882	5,015	4,913
ET16	5,385	6,321	4,89	5,532
ET18	3,793	4,395	3,889	4,026
NG	3,931	4,048	4,415	4,131
1Wo	2,077	1,936	1,775	1,929
2Wo	1,329	1,248	3,003	1,86
8Wo	1,566	1,359	n.a. ^[a]	1,4625
14Wo	1,433	1,834	0,943	1,403
42Wo	0,701	0,864	0,562	0,709
100Wo	1,152	1,78	n.a. ^[a]	1,466

^[a] nicht vorhanden.

Der altersabhängig variable Proteinspot, als Spotnummer 19 bezeichnet, ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 21, 22; Tabelle 25). Dieser wurde als ein Gemisch aus Myosin light chain 4 (Strukturprotein), MW: 21 kDa, pI: 4,96; Peroxiredoxin 2 (Peroxidase), MW: 22 kDa, pI: 5,2 identifiziert. In der Embryonalphase ist dieser Proteinspot in seinem Spotvolumen maximal. Der durchschnittliche Wert der Spotintensität beträgt ca. 4,9. In der Postnatal- und Adultphase reduziert sich die Spotintensität auf ca. 1,5. Demnach zeigt der altersabhängig variable Proteinspot ein herunterreguliertes Spotprofil über die Entwicklung.

Altersabhängig variabler Proteinspot: Spotnummer 20

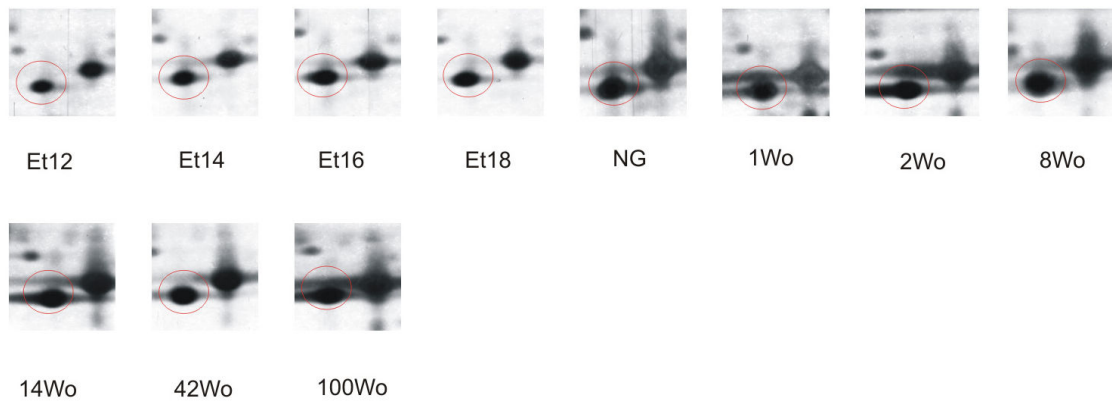


Abbildung 23: Bildliche Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 20 über die untersuchten Stadien.

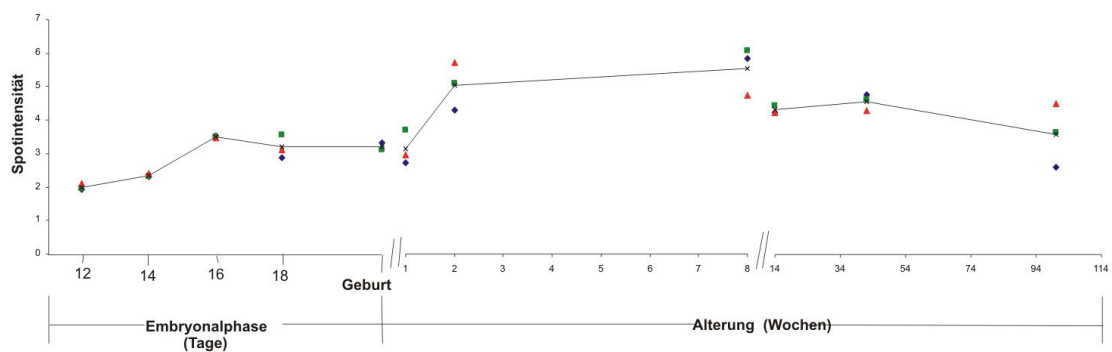


Abbildung 24: Graphische Darstellung des Spotprofils von Spotnummer 20.

Tabelle 26: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des Proteinspots Nummer 20.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	1,931	1,961	2,109	2,0
ET14	2,301	2,321	2,395	2,339
ET16	3,519	3,509	3,447	3,502
ET18	2,873	3,573	3,121	3,189
NG	3,332	3,103	n.a. ^[a]	3,218
1Wo	2,823	3,825	3,068	3,239
2Wo	4,433	5,253	5,902	5,196
8Wo	6,015	6,274	4,881	5,723
14Wo	4,369	4,593	4,386	4,449
42Wo	4,912	4,777	4,42	4,703
100Wo	2,685	3,772	4,65	3,702

^[a] nicht vorhanden.

Der altersabhängig variable Proteinspot, als Spotnummer 20 bezeichnet, ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 23, 24; Tabelle 26). Dieser wurde als Adenylatkinase isoenzym 1 (Phosphotransferase), MW: 22, pI: 5,67 identifiziert. In der Embryonalphase zum Zeitpunkt ET12 beträgt dessen Spotintensität 2. Im weiteren Verlauf steigt die Spotintensität dieses Proteinspots. Und erreicht ein Maximum zum Zeitpunkt der 8. Woche (ca. 6). Die Adultphase zeigt ein geringfügiges Absinken auf einen durchschnittlichen Wert von ca. 4. Demnach kann das Spotprofil dieses dargestellten Proteinspots in der Entwicklung als hochreguliert charakterisiert werden.

Unverändertes Profil eines Proteinspots in der Entwicklung

Im Folgenden soll ein zum Vergleich dienender Proteinspot in seinem Spotprofil dargestellt werden. Das Spotprofil bzw. die Spotintensität dieses dargestellten Spots ist nahezu unverändert. Daher soll dieser ein **Beispiel für einen in der Entwicklung nahezu konstanten Proteinspot** sein. Abgegrenzt hierzu zeigen die vorherig dargestellten altersabhängig variablen Proteinspots (sieben Beispiele) unregelmäßige, hochregulierte und herunterregulierte Spotprofile.

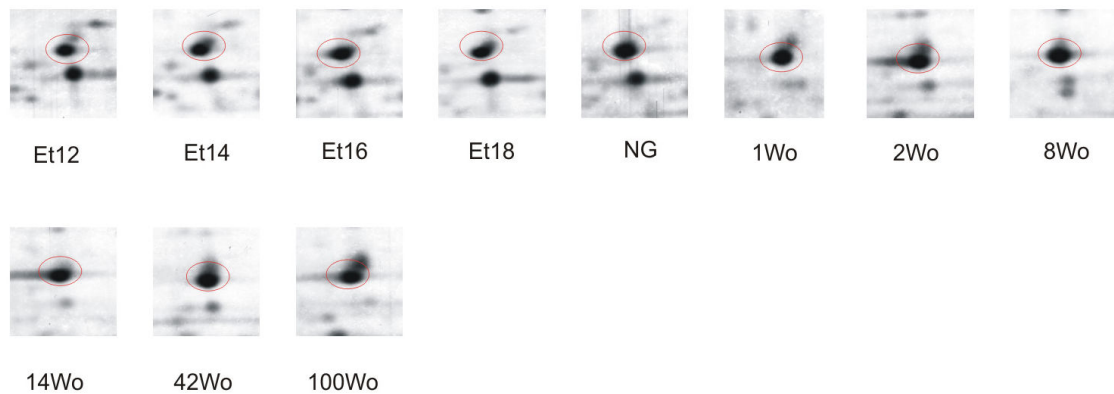


Abbildung 25: Bildliche Darstellung eines nahezu unveränderten Spotprofils über die untersuchten Stadien.

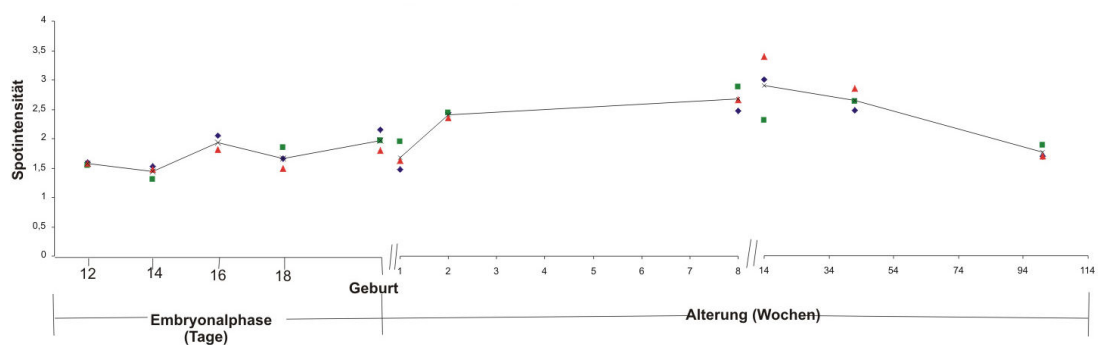


Abbildung 26: Graphische Darstellung des nahezu unveränderten Spotprofils.

Tabelle 27: Übersicht der Spotintensitäten (Software: Proteomweaver 2.1) des unveränderten Spotprofils.

Zeitpunkt	Spotintensität 1	Spotintensität 2	Spotintensität 3	Ø Spotintensität
ET12	1,598	1,535	1,574	1,569
ET14	1,523	1,31	1,483	1,439
ET16	2,058	n.a. ^[a]	1,812	1,935
ET18	1,658	1,846	1,486	1,663
NG	2,148	1,967	1,801	1,972
1Wo	1,522	2,014	1,675	1,737
2Wo	2,512	2,513	2,424	2,483
8Wo	2,556	2,962	2,751	2,756
14Wo	3,083	2,375	3,502	2,987
42Wo	2,543	2,707	2,93	2,727
100Wo	1,755	1,936	1,747	1,813

^[a] nicht vorhanden.

Der als Beispiel für ein nahezu unverändertes Spotprofil dienende Proteinspot ist über die Entwicklung in seiner Spotintensität bzw. in seinem Spotvolumen dargestellt (vgl. Abbildungen 25, 26; Tabelle 27). Dieser wurde als Prohibitin; Adaptermolekül; MW: 30 kDa; pI: 5,57 identifiziert. Die über die Entwicklung dargestellten Bildausschnitte dieses Proteinspots zeigen ein nahezu unverändertes Spotprofil seines Spotvolumens und der Spotintensität. Die mit der Software errechneten Daten zeigen ein Intervall der Spotintensität von ca. 1,5-3. Demnach müsste eine Verdoppelung des Spotvolumens im Proteinmuster ersichtlich sein. Hierbei wird deutlich, dass ein Werteunterschied der errechneten Spotintensitäten mit dem Bildverarbeitungsprogramm nicht mit einer in dem Proteinmuster ersichtlichen Änderung des Spotvolumens einhergehen muss. Identische Proteinspots können durch die Silberfärbung unterschiedliche „Schwärzungen“ trotz gleichbleibendem Spotvolumen annehmen. Durch das Einscannen der Proteinmuster für die computergestützte Auswertung wird die Information an Schwarz-Weiß-Unterschieden zusätzlich verfälscht. Diese Unterschiede zeigen sich in den rechnerischen Daten. Bei der visuellen Auswertung werden unterschiedliche Färbungstiefen der Proteinspots bei gleichbleibendem Spotvolumen nicht als Unterschied erfasst. Hierbei wird deutlich, dass die Auswertung von zu vergleichenden Proteinmustern nicht allein auf die visuelle als auch computergetützte Auswertung zu stützen ist. Sinnvoll ist eine ergänzende Auswertung.

Die Abbildungen 11-24 und die Tabelle 20-27 präsentieren das Spotprofil der sieben repräsentativen, altersabhängig variablen Proteinspots. Die Bildausschnitte bzw. die Graphiken belegen, wie eingangs erwähnt, die Altersabhängigkeit und das variable Spotprofil der Proteinspots.

4.2.3 Vorkommen bzw. Nichtvorkommen von Proteinen in bestimmten Entwicklungsphasen

Durch die Charakterisierung der Proteine in Abhängigkeit von Entwicklung und Alter wurden auch die **Proteine** erfasst, die ein **Vorkommen bzw. Nichtvorkommen in bestimmten Lebensphasen aufweisen**. Solche Proteine bzw. Proteingruppen treten/treten nicht in allen untersuchten Lebensstadien einer Lebensphase auf. Dieses bildet weiterhin eine Grundlage für mögliches Aufklären des Auftretens von Krankheiten in einem bestimmten Lebensalter. Hierzu wurden die gesamten Proteinmuster der Embryonalphase, Geburtsphase, Postnatalphase und Adultphase auf das Vorkommen bzw. Nichtvorkommen solcher einzelnen Proteinspots bzw. Proteinspotgruppen verglichen. Anschließend erfolgte eine massenspektrometrische Identifizierung dieser Proteinspots.

4.2.3.1 Expression des Peroxiredoxin 2 im Herzmuskel

Das Protein Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin 2) zeigte ein solches auffälliges Auftreten in bestimmten Lebensphasen der vorliegenden Untersuchung. Es konnte in der Embryonalphase bis einschließlich dem Zeitpunkt der Geburt bei sechs Proteinspots identifiziert werden. In der Postnatal- und Adultphase dagegen bei drei Proteinspots.

Peroxiredoxin 2 stellt ein Enzym der Peroxidasen dar [55, 56]. In biologischen Prozessen ist Peroxiredoxin 2 in die Energie- und Metabolismusprozesse involviert. Der Vergleich der Proteinexpressionsmuster und anschließende massenspektrometrische Untersuchung ergab die Identifizierung von Peroxiredoxin 2 bei sechs Proteinspots (vgl. Abbildung 27), welche sich im pH Bereich 4-6, MW: 22 kDa, des untersuchten Gelareals befanden. Es ist davon

auszugehen, dass das Peroxiredoxin 2 bei diesen sechs Proteinspots unterschiedlich modifiziert ist. Dieser Sachverhalt müsste mit weiterführenden Materialien und Methoden untersucht werden. Zusätzlich konnte für das identifizierte Peroxiredoxin 2 ein unterschiedliches Auftreten der sechs Proteinspots in den untersuchten Lebensphasen verzeichnet werden (vgl. Abbildung 27, 28).

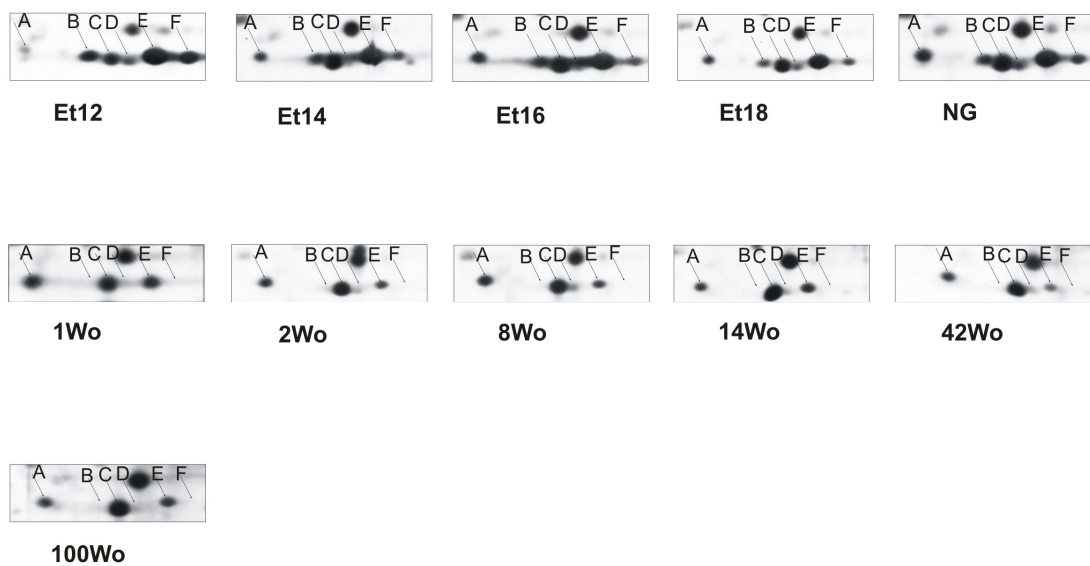


Abbildung 27: Verhalten des Peroxiredoxin 2 in der Entwicklung und des Alters; A-F wurde als Peroxiredoxin 2 identifiziert.

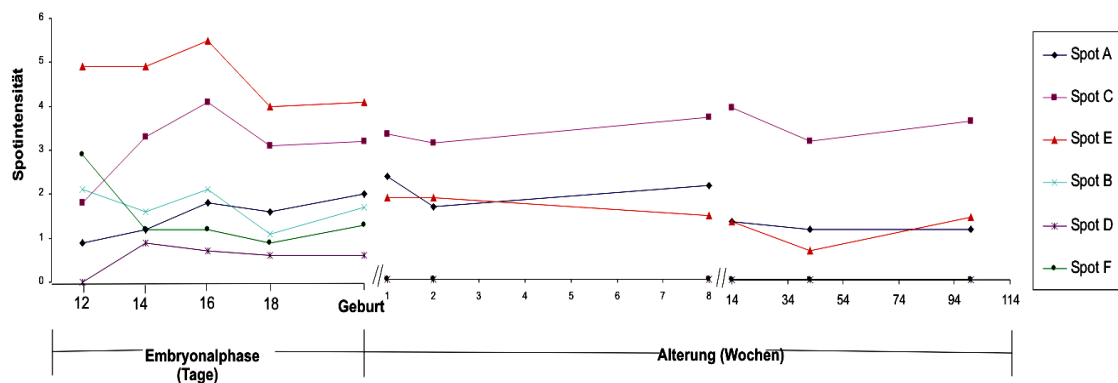


Abbildung 28: Entwicklungs- und Altersverlauf des Peroxiredoxin 2 der C57BL/6-Mäuse.

Wie in den Abbildungen 27, 28 dargestellt, zeigt Peroxiredoxin 2 bei den Proteinspots B, D, F innerhalb der Embryonalphase eine Erniedrigung der Spotintensität. Außerdem waren alle drei genannten Proteinspots nach dem Zeitpunkt der Geburt in den darauffolgenden Lebensstadien der Postnatal- und Adultphase abwesend (Der teilweise sichtbare Schatten an der Stelle des Proteinspots D in manchen Lebensstadien nach der Geburt entspricht keinem Proteinspot. Dieser tritt lediglich durch das „Tailing“ des benachbarten Spots auf). Das Peroxiredoxin 2, welches bei dem Proteinspot A identifiziert wurde, zeigte einen leichten Anstieg der Spotintensität in der Embryonalphase. Im Stadium der Geburt (NG) bzw. der 1. Woche erfährt dieser eine verstärkte Spotintensität. In den darauffolgenden Lebensstadien ist eine Erniedrigung der Spotintensität des Proteinspots A zu verzeichnen. Weiterhin präsentieren die Abbildungen 27, 28 eine höhere Intensität des Proteinspots E innerhalb der Embryonalphase bis einschließlich der Geburt (NG). Eine Abnahme der Spotintensität E zeigt sich in den darauffolgenden Lebensstadien, wobei sich ein Grenzwert der Spotintensität erkennen lässt.

4.3 Einfluss des Geschlechtes auf die Proteinexpressionsmuster

Durch den Vergleich der Proteinexpressionsmuster beider Geschlechter der Mausspezies *Mus musculus*, war es in diesem Zusammenhang möglich, geschlechtsspezifisch auftretende Proteine festzuhalten. Dieses bildet u.a. eine Grundlage für aufbauende Untersuchungen, die dem Aufklären von geschlechtsspezifisch auftretenden Erkrankungen dienen. Verglichen wurden hierbei die Proteinexpressionsmuster beider Geschlechter, beider Mäusestämme, C57BL/6 und DBA/2 der jeweiligen 14. Woche bzw. 100. Woche. Für jeden durchgeführten Vergleich der beiden Geschlechter (Mausstamm, Zeitpunkt) wurden drei Proteinexpressionsmuster mit der 2-DE dargestellt.

4.3.1 Geschlechtsspezifische Spotunterschiede der C57BL/6-Mäuse

Die geschlechtsspezifischen Spotunterschiede der C57BL/6-Mäuse (14. und 100. Wochen) sind in der Tabelle 28 wiedergegeben. Die Spotunterschiede umfassen Änderungen des Volumens und der Intensität der Proteinspots. Auffällige geschlechtsspezifische Spotunterschiede wurden zusätzlich als Bildausschnitte dargestellt (vgl. Abbildung 29). Diese wurden in den Proteinmustern beider Geschlechter zum Zeitpunkt der 100. Woche erfasst. Weiterhin wurden die dargestellten geschlechtsspezifischen Proteinspots mit der Massenspektrometrie in ihrer Proteinidentität bestimmt (vgl. Tabelle 29, 30).

Tabelle 28: Übersicht der geschlechtsspezifischen Spotunterschiede der Mausspezies *Mus musculus*, C57BL/6, 14. und 100. Woche.

Angabe des Stadiums und des Geschlechtes der variablen Spots (Vorh.=Vorhanden).

Spotprofil	Anzahl variabler Spots: 14. Wo ♀ vs. 14. Wo ♂	Anzahl variabler Spots: 100 Wo ♀ vs. 100.Wo ♂
Hochreguliert	3 (14.Wo, ♂)	5 (100.Wo, ♂) (keine Übereinstimmung zum Vergleich 14.Wo♀ vs. 14.Wo♂)
Herunterreguliert	3 (14.Wo, ♂)	2 (100.Wo, ♂) 1 Spot entspricht einem der 3 Spots aus Vgl. 14.Wo ♀ vs. 14.Wo ♂
Vorhanden/ Nicht vorhanden	1 (vorh.,14.Wo, ♂)	6 (vorh.,100.Wo, ♀) 9 (vorh., 100.Wo, ♂)
Summe	7 Spots	22 Spots

Aus der Tabelle 28 ist ersichtlich, dass für beide Zeitpunkte (14. und 100. Woche) insgesamt 29 geschlechtsspezifische Proteinspots festgestellt wurden. Der Vergleich der Proteinmuster der C57BL/6-Mäuse zu dem Zeitpunkt der 14. Woche (7 Proteinspots) weist weniger geschlechtsspezifische Spotunterschiede auf als der Vergleich der darauffolgenden Proteinmuster der 100. Woche (22 Proteinspots).

Eine Überschneidung der geschlechtsspezifisch variablen Proteinspots in der 14. und 100. Woche ist nur in einem Proteinspot zutreffend. Auffällig ist eine erhöhte Zahl der geschlechtsspezifischen Proteinspots in den Proteinmustern beider Geschlechter der 100. Woche. Diese wurden in der Abbildung 29 dargestellt.

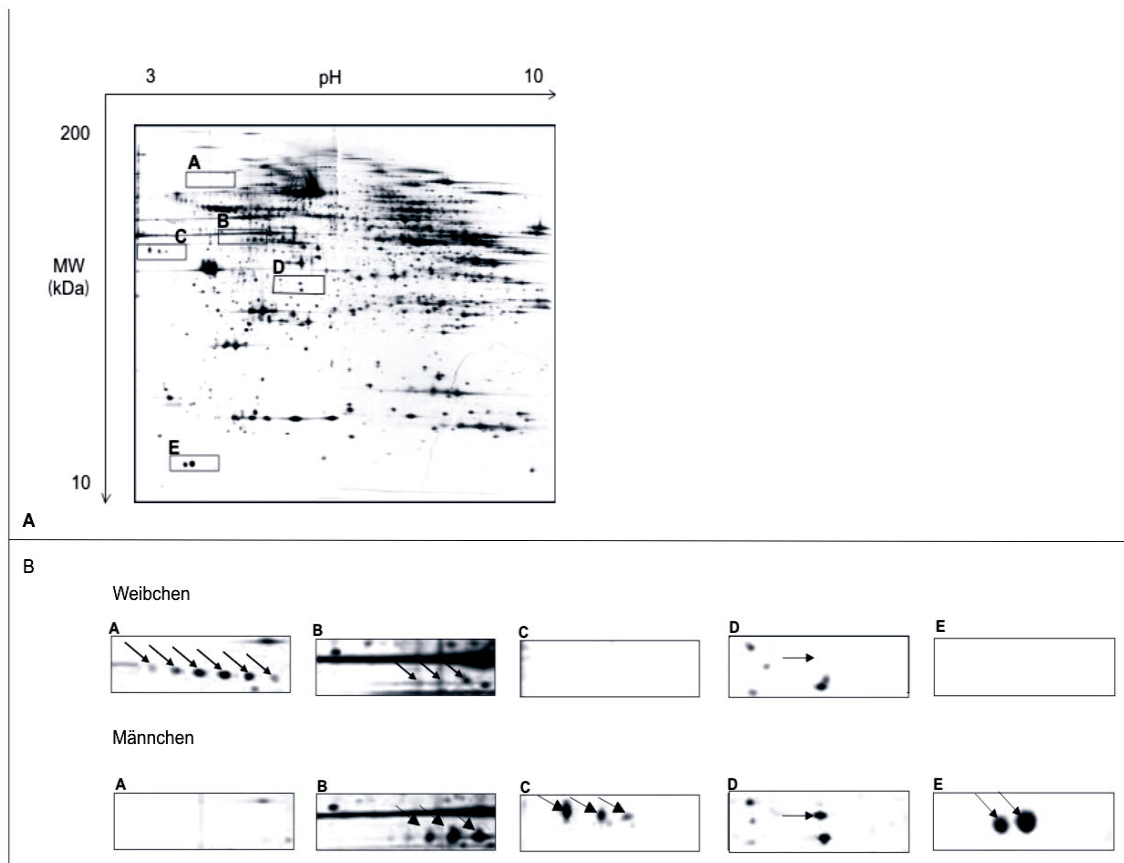


Abbildung 29: Geschlechtsspezifische Spotunterschiede der C57BL/6-Mäuse. Bild A: Gesamtgel mit markierten geschlechtsspezifischen Arealen (Männchen, 100. Woche); Bild B: Vergrößerung der markierten geschlechtsspezifischen Areale A-E.

Tabelle 29: Geschlechtsspezifische Proteine der C57BL/6-Mäuse. Massenspektrometrische Identifizierung der Proteinspots der Gelareale A-E aus Abbildung 29.

Proteinspot	Proteinidentität
Spot A	Carboanhydrase 2 (Multimer, MW: 29 kDa, pl: 5,2)
Spot B	Apolipoprotein A4 (MW: 45 kDa, pl: 5,1)
Spot C	Apolipoprotein J (MW: 52 kDa, pl: 4,6)
Spot D	Apolipoprotein E (MW: 36, pl: 5,2)
Spot E	Apolipoprotein A2 (MW: 11 kDa, pl: 4,7)

Die Abbildung 29 und die Tabelle 29 präsentieren geschlechtsspezifische Proteinspots, die beim Vergleich der Proteinexpressionsmuster der C57BL/6-Mäuse des Zeitpunktes der 100. Woche festgestellt wurden. Zusätzlich wurden die identifizierten Proteine und das geschlechtliche Auftreten für diese geschlechtsspezifischen Proteinspots angegeben.

Das Protein, Carboanhydrase 2 (CA2, MW: 29, pI: 5,2) konnte nur in den weiblichen C57BL/6-Mäusen als eine sechsgliedrige Proteinspotgruppe im Massenbereich von ca. 70-80 kDa identifiziert werden (vgl. Abbildung 29B: A) [57]. Die Carboanhydrase 2 weist theoretisch ein Molekulargewicht von 29 kDa auf. Dieser Sachverhalt lässt darauf schließen, dass die hier identifizierte CA2 eine Multimerstruktur aufweist. Des Weiteren konnten vier Proteinvertreter aus der Proteingruppe der Apolipoproteine identifiziert werden. Zunächst wurde das Apolipoprotein A4 (MW: 45, pI: 5,1) identifiziert, welches eine erhöhte Spotintensität in den männlichen C57BL/6-Mäusen aufweist (vgl. Abbildung 29B: B). Das Apolipoprotein J (Clusterin; MW: 37, pI: 4,6) konnte nur in den männlichen C57BL/6-Mäusen als ein Proteinglied aus drei Proteinspots bestehend [58], identifiziert werden (vgl. Abbildung 29B: C). Weiterhin konnte das Apolipoprotein E (MW: 36, pI: 5,2) ausschließlich in den männlichen C57BL/6-Mäusen identifiziert werden (vgl. Abbildung 29B: D). Das letzte Protein aus der Gruppe der Apolipoproteine wurde ebenfalls nur in den männlichen Tieren der C57BL/6-Mäuse identifiziert. Es handelt sich dabei um das Apolipoprotein A2 (MW: 11, pI: 4,7), welches hier als ein in seiner Spotintensität stark vorkommender Doppelspot sichtbar ist (vgl. Abbildung 29B: E).

Weiterhin konnte hierbei festgestellt werden, dass vier von fünf ermittelten geschlechtsspezifischen Proteinen als Spotgruppen (mehrere Proteinspots) vorkommen. Die Carboanhydrase 2 bildet eine sechsgliedrige Proteinspotgruppe. Die Proteine Apolipoprotein J und Apolipoprotein A4 stellen eine dreigliedrige Proteinspotgruppe dar. Für das Apolipoprotein A2 konnte ein Doppelspot festgehalten werden.

Das Recherchieren mittels Proteindatenbanken ermöglichte eine nähere Charakterisierung dieser geschlechtsspezifischen Proteine in ihrer Proteinfunktion (vgl. Tabelle 30).

Tabelle 30: Zusammenfassung der geschlechtsspezifischen Proteine mit Angabe der Proteinfunktion und der Präsenz des betreffenden Organismus.

Proteinidentität	Proteinfunktion	Präsenz im Organismus
Carboanhydrase 2	pH Regulation, Energie und Metabolismus	C57BL/6, Weibchen
Apolipoprotein A4	Lipidmetabolismus	C57BL/6, Weibchen C57BL/6, Männchen
Apolipoprotein J	Assoziation mit Zelltod, Lipidmetabolismus, Komplementsystemaktivierung	C57BL/6, Männchen
Apolipoprotein E	Transport; Speicherung	C57BL/6, Männchen
Apolipoprotein A2	Lipidmetabolismus	C57BL/6, Männchen

Aus der Tabelle 30 ist ein auffälliges geschlechtsspezifisches Auftreten der Apolipoproteine (A4, J, E, A2) in den C57BL/6-Mäusen (100. Woche) zu ersehen. Hierbei kann ein bevorzugtes Auftreten dieser in den männlichen C57BL/6-Mäusen (100. Woche) beobachtet werden.

4.3.1.1 Geschlechtsspezifische Expression verschiedener Isoformen des Serinproteaseinhibitors α 1-Antitrypsin bei den C57BL/6-Mäusen

Weitere Unterschiede ergab der Vergleich der Proteinexpressionsmuster der C57BL/6-Mäuse. Verglichen wurden, wie erwähnt, die Proteinmuster beider Geschlechter der 14. und 100. Woche. Es konnten drei Isoformen des Serinproteaseinhibitors (SERPIN) α 1-Antitrypsin im Massenbereich von ca. 60-70 kDa, pH Bereich 3-5 mit geschlechtsspezifischer und altersspezifischer Expression identifiziert werden. Das theoretische Molekulargewicht des α 1-Antitrypsins beträgt 61 kDa und der zugehörige isoelektrische Punkt entspricht 4. Die Isoformen der vorliegenden Untersuchung umfassen das α 1-Antitrypsin 1-1, 1-3, und 1-5.

In den Abbildungen 30, 31 sind die genannten Isoformen des α 1-Antitrypsin in ihrem geschlechtsspezifischen Auftreten dargestellt (14. und 100. Woche). Weiterhin ist eine Altersabhängigkeit dieser genannten Isoformen (Proteinspots) ersichtlich. In den beiden Abbildungen ist der mit Pfeilen markierte Doppelspot als ein Gemisch aus den Isoformen des α 1-Antitrypsin 1-1, 1-5 und einem weiteren Protein der Proteindisulfidomerase (PDI) identifiziert worden. Der einzelne Proteinspot wurde als das α 1-Antitrypsin 1-3 identifiziert. Diese genannten drei Isoformen konnten in dem Proteinexpressionsmuster des Zeitpunktes der 14. Woche in beiden Geschlechtern nachgewiesen werden. Die identifizierten Proteinspots zeigten in den Proteinexpressionsmustern der weiblichen C57BL/6-Mäuse zum Zeitpunkt der 14. Woche eine deutlich geringere Spotintensität im Vergleich zu den identifizierten Proteinspots in den Proteinexpressionsmustern der männlichen C57BL/6-Mäuse des Zeitpunktes der 14. Woche. Der Vergleich der Proteinexpressionsmuster beider Geschlechter des Zeitpunktes der 100. Woche ergab eine Abwesenheit der drei genannten Isoformen des α 1-Antitrypsins in den Proteinmustern der weiblichen C57BL/6-Mäuse. Bei den Proteinmustern des Zeitpunktes der 100. Woche der männlichen C57BL/6-Mäuse dagegen blieben diese drei Isoformen des α 1-Antitrypsins in ihrer Anwesenheit und Spotintensität bestehen. Zusammenfassend konnte eine geschlechtsspezifische Expression der Isoformen 1-1, 1-3, 1-5 des α 1-Antitrypsins in den C57BL/6-Mäusen festgestellt werden. Zusätzlich konnte in diesem Zusammenhang eine altersabhängige Expression der Isoformen des α 1-Antitrypsins 1-1, 1-3, 1-5 in den C57BL/6-Mäusen beobachtet werden.

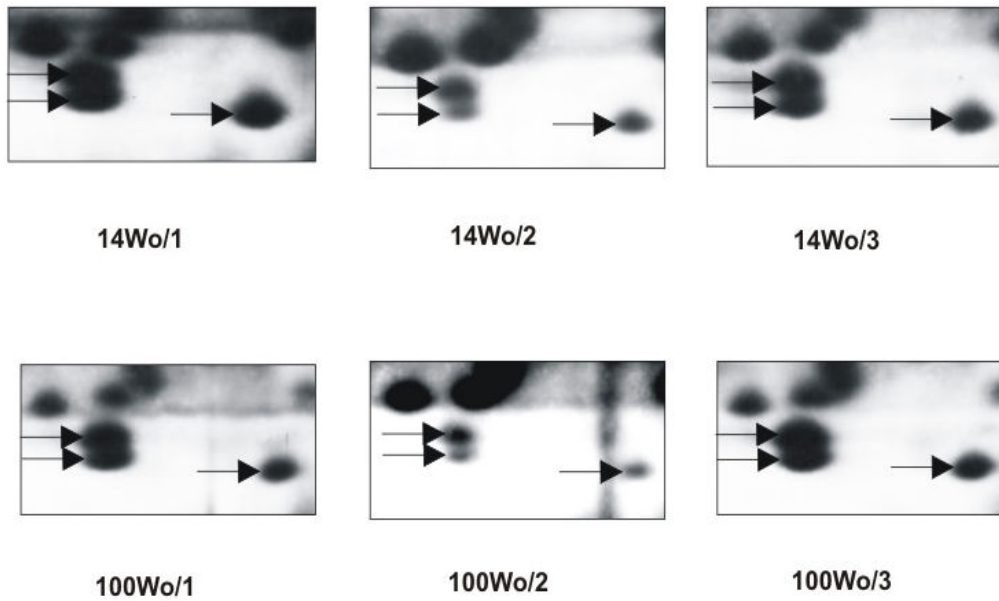


Abbildung 30: Expression der Isoformen 1-1, 1-3, 1-5 des α 1-Antitrypsin in den drei Probenpaaren der **männlichen Tiere** der C57BL/6-Mäuse. Doppelspot: Gemisch aus α 1-Antitrypsin 1-1, 1-5 und Proteindisulfidisomerase. Einzelner Proteinspot: α 1-Antitrypsin1-3.

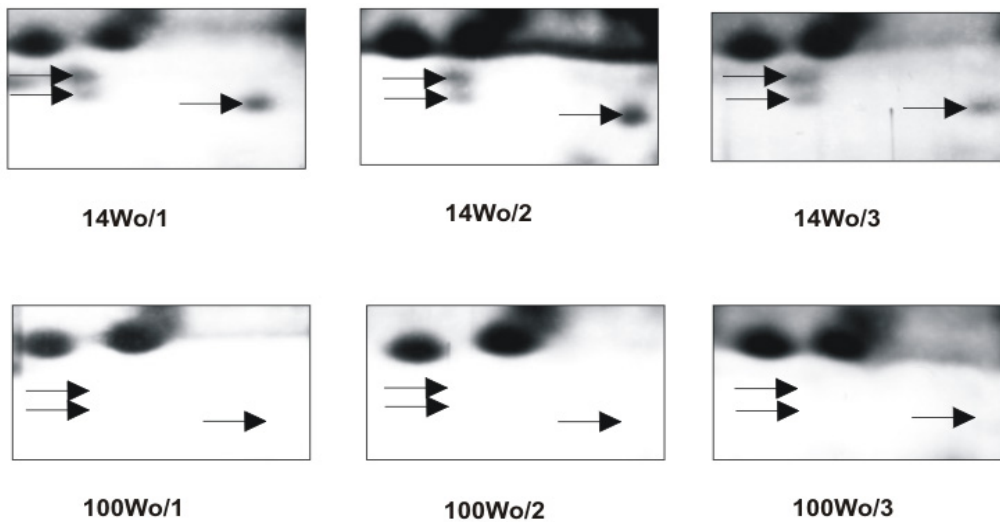


Abbildung 31: Expression der Isoformen 1-1, 1-3, 1-5 des α 1-Antitrypsin in den drei Probenpaaren der **weiblichen Tiere** der C57BL/6-Mäuse. Doppelspot: Gemisch aus α 1-Antitrypsin 1-1, 1-5 und Proteindisulfidisomerase. Einzelner Proteinspot: α 1-Antitrypsin1-3.

4.3.2 Geschlechtsspezifische Spotunterschiede der DBA/2-Mäuse

Im Folgenden sind die geschlechtsspezifischen Spotunterschieden der DBA/2-Mäuse in der Tabelle 31 wiedergegeben. Die Spotunterschiede umfassen Änderungen des Volumens und der Intensität der Proteinspots. Auffällige geschlechtsspezifische Spotunterschiede wurden zusätzlich als Bildausschnitte dargestellt (vgl. Abbildung 32). Die darin dargestellten geschlechtsspezifischen Proteinspots wurden in ihrer Proteinidentität bestimmt (vgl. Tabelle 32).

Tabelle 31: Übersicht der geschlechtsspezifischen Spotunterschiede der Mausspezies *Mus musculus*, DBA/2, 14. und 100. Woche,
Angabe des Stadiums und des Geschlechtes der variablen Spots (vorh.= vorhanden; nicht vorh.= nicht vorhanden).

Spotprofil	Anzahl variabler Spots: 14. Wo ♀ vs. 14. Wo ♂	Anzahl variabler Spots: 100 Wo ♀ vs. 100.Wo ♂
Hochreguliert	4 (14.Wo, ♂)	-
Herunterreguliert	10 (14. Wo, ♂)	2 (100.Wo, ♂) (1 Spot entspricht einem der 10 Spots aus Vgl. 14.Wo ♀ vs. 14.Wo ♂)
Vorhanden/ Nicht vorhanden	3 (vorh.,14.Wo, ♂) 1 (nicht vorh.,14. Wo, ♂)	-
Summe	18 Spots	2 Spots

Aus der Tabelle 31 ist ersichtlich, dass insgesamt 20 Proteinspots als Geschlechtsunterschiede bei den DBA/2-Mäusen bestimmt wurden. Die Proteinmuster der DBA/2-Mäuse, 100. Woche (2 Proteinspots) weisen weniger geschlechtsspezifische Spotunterschiede gegenüber den DBA/2-Mäuse, 14. Woche (18 Proteinspots) auf. Dabei wurde einer der geschlechtsspezifischen

Proteinspots in beiden Proteinmustern der 14. und 100. Woche als variabler Proteinspot festgestellt.

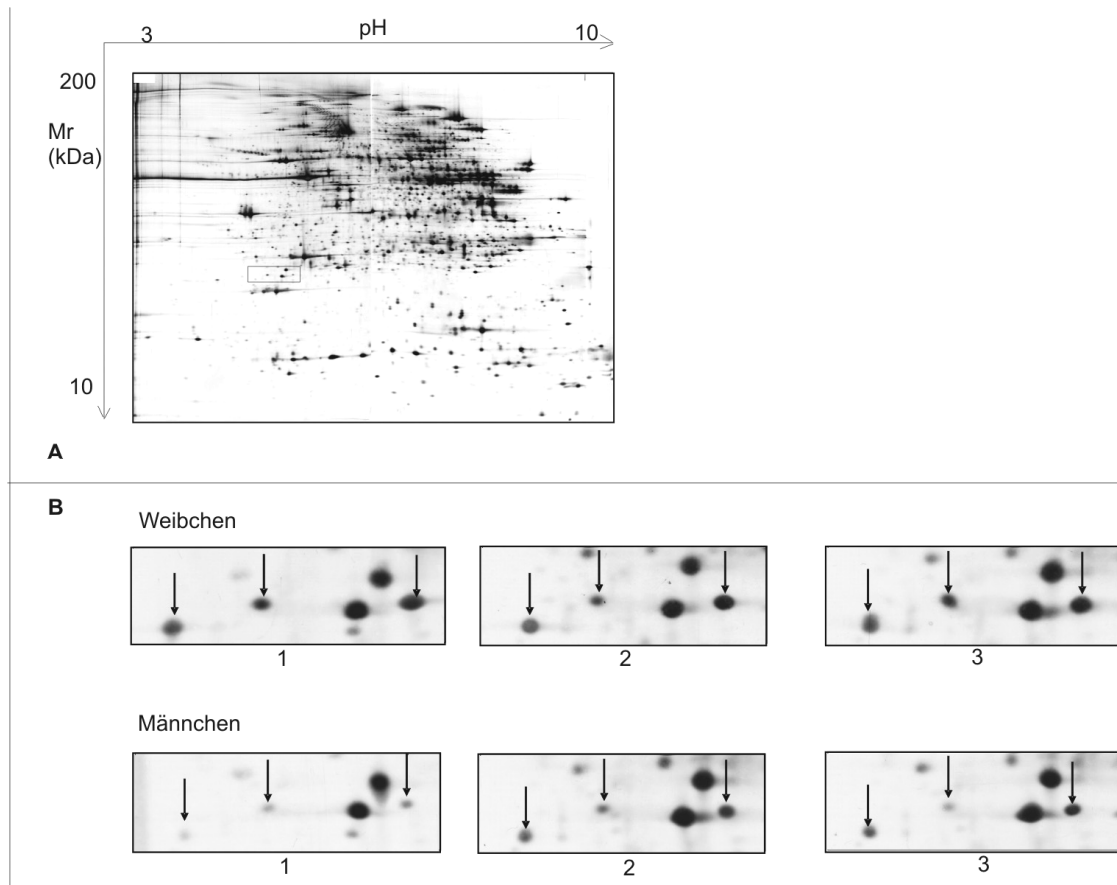


Abbildung 32: Bildausschnitte auffälliger, geschlechtsspezifischer Proteinspots der DBA/2-Mäuse (14. Woche). A: Gesamtgel mit markiertem Rechteck des folgenden Bildauschnittes. B: Bildausschnittvergrößerung dreier mit Pfeilen markierten Proteinspots (Links, Mitte, Rechts). Vorkommen in allen drei Gelpaaren des jeweiligen Geschlechtes. Massenbereich ca. 18-22 kDa, pI-Bereich 4-5.

Tabelle 32: Übersicht der Proteinidentität und –funktion der auffälligen geschlechtsspezifischen Proteinspots der DBA/2-Mäuse aus Abbildung 32.

Die Proteine sind mit den Bezeichnungen Links, Mitte, Rechts aus Abbildung 32 übernommen.

Proteinspot	Proteinidentität	Proteinfunktion
Links	Myosin leichte Kette 2 (MW: 18; pl: 4,5)	Strukturprotein
Mitte	Peroxiredoxin 2 (MW: 22 kDa; pl: 5,2)	Energie/Metabolismus
Rechts	Mix: 1. Peroxiredoxin 2; 2. Myosin leichte Kette 4 (MW: 22 kDa; pl:5)	s.o

Die Abbildung 32 präsentiert ein Bildausschnitt der Proteinmuster der weiblichen und männlichen DBA/2-Mäuse. Die darin mit Pfeilen markierten Proteinspots zeigen ein geschlechtsspezifisches Verhalten in den Proteinmustern. Alle drei Proteinspots sind in den weiblichen Proteinmustern (14. Woche) im Vergleich zu den männlichen Proteinmustern in ihrer Spotintensität erhöht. Die Tabelle 32 gibt die für die Proteinspots mit der Massenspektrometrie identifizierten Proteine wieder. Darauf aufbauend wurde die Proteinfunktion recherchiert. Die Proteinfunktionen der drei geschlechtsspezifischen Proteine umfassen die Funktionsbereiche: Strukturprotein, Energie/Metabolismus.

4.3.3 Vergleich der geschlechtsspezifischen Spotunterschiede der C57BL/6- und DBA/2-Mäuse

In diesem Kapitel werden die geschlechtsspezifischen Spotunterschiede der Mäusestämme der DBA/2 und C57BL/6 verglichen (vgl. Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). Diese Spotunterschiede umfassen Änderungen des Volumens und der Intensität der Proteinspots (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden). Die Tabelle 33 gibt diese Inhalte wieder. Hierbei wurde die Zahl der geschlechtsspezifischen Proteinspots angegeben, die in den jeweiligen Mäusestämmen verändert war. Weiterhin erfolgte eine Unterteilung in das jeweilige Alter von 14 und 100 Wochen. Zusätzlich wurde für die geschlechtsspezifisch variablen Proteinspots, die in beiden Mäusestämmen als

solche festgestellt wurden, das Spotprofil angegeben. Um eine Einordnung der Zahl der geschlechtsspezifischen Proteinspots in das gesamte Proteinmuster des Herzmuskels zu schaffen, wurde der prozentuale Anteil (visuell ermittelte Gesamtspotzahl) dieser errechnet.

Tabelle 33: Gegenüberstellung der geschlechtsspezifischen Spotunterschiede der DBA/2- und C57BL/6-Mäuse.

Angabe der Anzahl der variablen Spots und des Spotprofils, die in beiden Mäusestämmen als geschlechtsspezifische Proteinspots vorkommen.

	C57BL/6	DBA/2
• Geschlechtsspezifische Spotunterschiede pro Mäusestamm	29	20
• %Anteil im Gesamtmuster (visuell: 3100 Spots)	0,94 %	0,65 %
• Anzahl variabler Spots, die in beiden Mäusestämmen der 14. Woche geschlechtsspezifisch auftraten	2 Spots (in beiden herunterreguliert)	
• Anzahl variabler Spots, die in beiden Mäusestämmen der 100. Woche geschlechtsspezifisch auftraten	1 Spot (in beiden hochreguliert) 1 Spot (in beiden herunterreguliert) 2 Spots (in beiden anwesend)	

Die Tabelle 33 gibt die Gegenüberstellung der geschlechtsspezifischen Spotunterschiede, die jeweilig für die beiden Mäusestämme DBA/2 und C57BL/6 ausgewertet wurden, wieder. Hierbei sei nochmals aufgeführt, dass die geschlechtsspezifischen Spotunterschiede der C57BL/6-Mäuse 29 (0,94 %) Proteinspots umfassen. Dagegen 20 (0,65 %) geschlechtsspezifische Proteinspots für die DBA/2-Mäuse ausgewertet wurden. Insgesamt konnten sechs Proteinspots als Schnittmenge für geschlechtsspezifische Proteinspots der beiden Mäusestämme erfasst werden. Zwei dieser geschlechtsspezifischen Proteinspots wurden in den Proteinmustern der 14. Woche festgestellt. Dabei zeigten diese Proteinspots ein identisches Spotprofil (herunterreguliert) in dem jeweiligen Vergleich beider Geschlechter. Die weiteren vier Proteinspots konnten in den Proteinmustern der 100. Woche festgestellt werden. Auch hier zeigten diese geschlechtsspezifischen Proteinspots, in dem jeweiligen Vergleich beider Geschlechter, das gleiche Spotprofil.

Einerseits lässt sich schlussfolgern, dass geschlechtsspezifische Proteinspots des jeweiligen Mäusestammes in den Proteinmustern beider Stämme ein solches geschlechtsspezifisches Auftreten zeigen (Verwandtschaft, gleiche Mausspezies). Andererseits sind auch geschlechtsspezifische Proteinspots nur für die Proteinmuster eines Mausstamms charakteristisch. Außerdem ist die Zahl der geschlechtsspezifischen Spotunterschiede des jeweiligen Mausstamms ähnlich und im Vergleich zu der Gesamtspotzahl des Proteinmusters des Herzmuskels gering.

4.4 Einfluss der genetischen Variabilität auf die Proteinexpressionsmuster

Polymorphismen von Proteinen können Hinweise liefern für die Frage, ob bestimmte phänotypische Merkmale wie Geschlechts- und Altersunterschiede genetisch determiniert sind oder nicht. Daher wurde die genetische Variabilität der Proteinmuster des Herzens zwischen den beiden **Mausspezies, *Mus musculus* (C57/BL/6) und *Mus spretus* (MSPR)** untersucht (vgl. Abbildung 33).

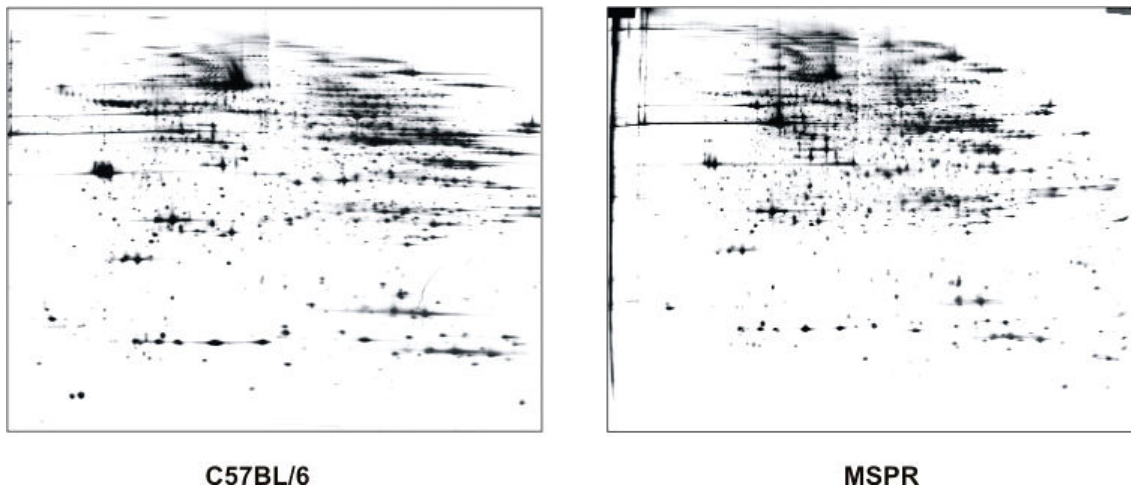


Abbildung 33: Proteinmuster der Mausspezies C57BL/6 und MSPR (Alter: 100 Wochen).

4.4.1 Vergleich der Proteinexpressionsmuster der Mausspezies *Mus musculus* und *Mus spretus*

Für die Untersuchung wurden einerseits die Proteinexpressionsmuster von männlichen C57BL/6-Mäusen im Alter von 14 und 100 Wochen und andererseits die Proteinexpressionsmuster von männlichen *Mus spretus* (MSPR) Mäusen im Alter von 14 und 100 Wochen, mit der 2-DE angefertigt. Von Bedeutung war die Charakterisierung der Spotunterschiede, die Proteinpolymorphismen darstellen. Diese Spotunterschiede entsprechen Änderungen des Spotvolumens und der Spotintensität (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden). Zusätzlich wurden Änderungen der Spotposition erfasst, d.h. Verschiebungen der Proteinspots in horizontaler, vertikaler und diagonaler Richtung. Es wurden zunächst die Spotunterschiede in den Proteinmustern der 14. Woche beider Mausspezies ermittelt (vgl. Tabelle 34). Anschließend wurden die festgestellten Proteinpolymorphismen mit den Proteinmustern der 100. Woche beider Mausspezies abgeglichen. Somit wurden die altersabhängig variablen Proteinpolymorphismen untersucht und festgehalten.

Tabelle 34: Übersicht der Spotunterschiede und der Proteinpolymorphismen der Mausspezies MSPR vs. C57BL/6, in den Proteinmustern der 14. Woche (14.Wo). Angabe des prozentualen Anteils in Bezug auf die ermittelten Proteinpolymorphismen (160 Spots).

Spotprofil	Anzahl variabler Spots (Vgl.: MSPR vs. C57BL/6 ; 14.Wo)	Prozentualer Anteil [%]
Hochreguliert	24	15
Herunterreguliert	24	15
Vorhanden: Entstehung von Spotserien:	25 Dreigliedrige Spotgruppe	16
Nicht vorhanden: Fehlen von Isoformen einer Spotgruppe:	30 8	19
Positionsverschiebung (horizontal, vertikal, diagonal)	57	36
Summe	160	100

Die Tabelle 34 zeigt, dass die Proteinmuster beider Mausspezies der 14. Woche unterschiedlich sind. Hierbei konnten 160 Proteinpolymorphismen festgestellt werden. Diese zeigten sich in allen Bereichen der Proteinmuster, d.h. im hoch- und niedermolekularen sowie im sauren und basischen Bereich. Hierbei konnten Veränderungen des Volumens und der Intensität der Proteinspots (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden) erfasst werden. Des Weiteren wurden Änderungen der Spotposition erfasst, d.h. Verschiebungen der Proteinspots in horizontaler, vertikaler und diagonaler Richtung. Zunächst konnte eine dreigliedrige Spotserie in den Proteinmustern der MSPR-Mäuse (14. Woche) festgestellt werden. Diese zeigte sich in den Proteinmustern der C57BL/6-Mäuse (14. Woche) als ein singulärer Proteinspot. Außerdem konnte ein Fehlen von acht Proteinspots, die Isoformen der mehrgliedrigen Spotgruppe des α 1- Antitrypsins (MW: 60-70 kDa, pl: 3-5)

darstellen, erfasst werden. Weiterhin konnten Positionsverschiebungen der Proteinspots in vertikaler, horizontaler und diagonaler Richtung festgestellt werden. Diese waren mit ca. 36 % am meisten vertreten. Wobei die Zahl der Verschiebungen der Proteinspots in vertikaler Richtung, d.h. zu den höheren und niederen Molekulargewichten, sehr gering ist. Verschiebungen in horizontaler Richtung, d.h. zu den höheren und niederen pI Werten, bilden den größeren Part.

Anschließend wurden die dargestellten 160 Proteinpolymorphismen der 14. Woche mit den Proteinmustern der 100. Woche beider Mausspezies verglichen. Hierbei wurden altersabhängig variable Proteinpolymorphismen untersucht. Zunächst konnten insgesamt drei altersabhängige Proteinpolymorphismen in den Referenzgelen festgehalten werden. Diese sollen hier der Einfachheit halber als Proteinspots A, B, C bezeichnet werden. Proteinspot A ist ein Proteinspot mit saurem pI Wert, die Proteinspots B und C dagegen, Proteinspots mit basischem pI Wert. Es handelt sich bei dem Proteinspot B um einen Spot, der in dem Proteinmuster der 100. Woche (MSPR) wieder auftauchte. Zuvor war dieser im Vergleich der Proteinmuster der 14. Woche beider Spezies in den MSPR nicht vorhanden. Die Proteinspots A, C zeigten eine horizontale „Rückverschiebung“ in ihre Ausgangsposition in den Proteinmustern der 100. Woche beider Mausspezies. Proteinspot A zeigte eine „Rückverschiebung“ in den C57BL/6-Mäusen und Proteinspot C eine „Rückverschiebung“ in den MSPR-Mäusen.

Allerdings konnte durch den weiteren Vergleich der jeweiligen Gelpaare kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden, aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit der altersabhängigen Proteinspots A, B, C. Tabelle 35 gibt genannte Schwierigkeiten wieder.

Tabelle 35: Reproduzierbarkeit der altersabhängig variablen Proteinpolymorphismen A, B, C in den Proteinmustern von *Mus musculus* und *Mus spretus*.

Ausgewertete Gelpaare für 1. MSPR 14. Wo: 5 Gelpaare; 2. MSPR 100. Wo, C57BL/6 14. und 100. Wo: 6 Gelpaare.

Variabler Proteinspot	Anzahl der Gelpaare mit gleicher Position des Proteinspots	Anzahl der Gelpaare mit variabler Position des Proteinspots
Spot A	5	6 1 x nicht present
Spot B	4	1x nicht present in Referenzgel!
Spot C	5	6

Der Tabelle 35 ist zu entnehmen, dass bei einer jeweiligen Zahl von 5 bzw. 6 Gelpaaren der einzelnen Mausspezies, die Proteinspots A, B, C in den Proteinmustern nicht eindeutig reproduzierbar sind. Diese Proteinspots wurden als altersabhängige Proteinpolymorphismen ermittelt. Bei Proteinspot B sei erwähnt, dass der ermittelte Unterschied (ein nicht vorhandener Spot) im Referenzgel ermittelt wurde. Proteinspot B konnte allerdings in allen weiteren Gelpaaren als present ermittelt werden. Demnach ist der Proteinspot B kein altersabhängig variabler Proteinpolymorphismus.

Hierbei kann festgehalten werden, dass die meisten der 160 ermittelten Proteinpolymorphismen zwischen *Mus musculus* und *Mus spretus* nicht altersabhängig sind.

4.4.1.1 Altersabhängige Proteinspots und Proteinpolymorphismen

Im Folgenden Kapitel wurden die unter 4.2.2 altersabhängig variablen Proteinspots auf Polymorphismen verglichen. Die Proteinpolymorphismen wurden zwischen den Mausspezies *Mus musculus* und *Mus spretus* ausgewertet (vgl. Kapitel 4.4.1). Die altersabhängigen Proteinspots wurden für die jeweiligen Entwicklungsphasen ermittelt.

Tabelle 36 gibt diese Inhalte wieder. Hierbei wurde die Nummerierung der altersabhängigen Proteinspots aus der Tabelle 9 übernommen. Jeder altersabhängige Proteinspot wurde nun mit den Proteinspots, die Polymorphismen zwischen *Mus musculus* und *Mus spretus* darstellen, verglichen und entsprechend aufgeführt (vgl. Tabelle 36).

Tabelle 36: Altersabhängige Proteinspots und Polymorphismen.

Lebensphasen, in den die altersabhängig variablen Proteinspots verändert waren: A: Adult; P: Postnatal; G: Geburt; E: Embryonal. Markierte Spots sind zugleich polymorph.

Spotnr.	betreffende Lebensphase	Polymorphismus (MSPR vs. C57BL/6)
1	A, P	nicht polymorph
2	A, P	Hochreguliert
3	A, P	nicht polymorph
4	P, G	nicht polymorph
5	P, G	nicht polymorph
6	A, P, G	nicht polymorph
7	P, G	Hochreguliert
8	A, G, E	Herrunterreguliert
9	A, P	nicht polymorph
10	A, P	nicht polymorph
11	A	Horizontalverschiebung (links)
12	P, G	nicht polymorph
13	P	nicht polymorph
14	P, G	nicht polymorph
15	A, G, E	Herrunterreguliert
16	A, P, G, E	Herrunterreguliert
17	A, P, E	Horizontalverschiebung (rechts)
18	A, P, G, E	Hochreguliert
19	A, P, G	Herrunterreguliert
20	A, P, E	Horizontalverschiebung (rechts)
21	A, P	Horizontalverschiebung (links)
22	P, G	Horizontalverschiebung (links)
23	P, G	Horizontalverschiebung (links)
24	A, P	Horizontalverschiebung (links)
25	P, G	nicht polymorph
26	P, G	nicht polymorph
27	P, G	Horizontalverschiebung (links)
28	E	Horizontalverschiebung (links)

Tabelle 37: Darstellung des prozentualen Anteils der altersabhängigen Proteinspots, die zugleich polymorph sind.

28 altersabhängig variable Proteinspots; 160 Proteinpolymorphismen zwischen C57BL/6 und *Mus spretus*.

Proteinspots, die altersabhängig und polymorph sind	Altersabhängig variable Proteinspots	Polymorphismen
16	28	160

Aus den Tabellen 36, 37 ist ersichtlich, dass von den 28 altersabhängig variablen Spots, 16 Spots zugleich polymorphe Spots waren und 12 Spots keine polymorphen Spots darstellen. Hierbei sind die Proteinspots in ihrem Volumen und ihrer Intensität (hochreguliert, herunterreguliert) sowie in ihrer Position (horizontale, vertikale Positionsverschiebung) verändert.

4.4.1.2 Geschlechtsspezifische Proteinspots und Proteinpolymorphismen

Im Folgenden werden die unter 4.3 vorgestellten geschlechtsspezifischen Proteinspots auf Proteinpolymorphismen verglichen. Die Proteinpolymorphismen wurden zwischen den Mausspezies *Mus musculus* und *Mus spretus* herausgefunden (vgl. Kapitel 4.4.1). Die geschlechtsspezifischen Proteinspots wurden an zwei Mäusestämmen (C57BL/6; DBA/2) untersucht. Die Tabellen 38, 39 geben diese Inhalte wieder.

Tabelle 38: Darstellung der geschlechtsspezifischen Proteinspots der C57BL/6-Mäuse und dessen Korrelation zu Proteinpolymorphismen (MSPR vs. Mm).

Angabe des Spotprofils, der Proteinspots, die sowohl geschlechtsspezifisch als auch polymorph sind. Die Proteine wurden mit ihrer Proteinidentität aufgeführt.

Anzahl der geschlechtsspezifischen Proteinspots bei C57BL/6	Korrelation zu Polymorphismen (MSPR vs. C57BL/6)
• 3 Proteinspots als α 1- Antitrypsin identifiziert	Spots nicht vorhanden in MSPR
• 3 Proteinspots als polymorph Apolipoprotein A4 identifiziert	Spots sind nicht
• 1 Proteispot als Apolipoprotein E identifiziert	Spot nicht vorhanden in MSPR
• 2 Proteinspots als Apolipoprotein A2 identifiziert	Spots nicht vorhanden in MSPR
• 6 Proteinspots als Carboanhydrase 2 identifiziert	Spots nicht vorhanden in MSPR

Tabelle 39: Darstellung der geschlechtsspezifischen Proteinspots der DBA/2-Mäuse und dessen Korrelation zu Proteinpolymorphismen (MSPR vs. Mm).

Angabe des Spotprofils, der Proteinspots, die sowohl geschlechtsspezifisch als auch polymorph sind. Die Proteine wurden mit ihrer Proteinidentität aufgeführt.

Anzahl der geschlechtsspezifischen Proteinspots der DBA/2	Korrelation zu Polymorphismen (MSPR vs. DBA/2)
• 4 Proteinspots	polymorphe Spots (hochreguliert)
• 3 Proteinspots	polymorphe Spots (herrunterreguliert)
• 13 Proteinspots	keine polymorphen Spots

Die Tabelle 38 gibt die Beziehung der geschlechtsspezifischen Proteinspots der C57BL/6-Mäuse und der Proteinpolymorphismen (MSPR vs. C57BL/6) wieder. Es ist ersichtlich, dass keiner der geschlechtsspezifischen Proteinspots zusätzlich polymorphes Verhalten zeigt. Bis auf einen Proteinspot (Apolipoproteins A4) sind alle weiteren nicht in den Proteinmustern der MSPR vorzufinden. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die geschlechtsspezifischen Proteinspots der C57BL/6-Mäuse zugleich keine polymorphen Spots darstellen. Die Tabelle 39 gibt die Beziehung der geschlechtsspezifischen Proteinspots der DBA/2-Mäuse und der Proteinpolymorphismen (MSPR vs. DBA/2) wieder. In dem Vergleich (DBA/2-Mäuse; beide Geschlechter; 14. und 100. Woche) konnten 20 geschlechtsspezifische Proteinspots ermittelt werden. Von diesen 20 Proteinspots sind sieben Proteinspots zugleich polymorphe Proteinspots (vier Proteinspots hochreguliert; 3 Proteinspots herunterreguliert) und 13 Proteinspots sind nicht polymorph.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die geschlechtsspezifischen Proteinspots der DBA/2-Mäuse meistens nicht polymorph sind.

4.5 Einfluss unterschiedlicher Lebensspannen auf die Proteinexpressionsmuster

In der vorliegenden Grundlagenstudie wurde neben den in vorherigen Kapiteln behandelten Untersuchungskriterien wie Alter, Geschlecht und genetische Variabilität auch der Einfluss unterschiedlich langer Lebensspannen bei zwei Mäusestämmen untersucht. Möglicherweise können Proteine charakterisiert werden, die für eine vorzeitige Alterung eines Organismus verantwortlich sind.

4.5.1 Vergleich der Proteinexpressionsmuster der Mäusestämme; DBA/1J und DBA/2

Hierbei wurden zwei Vertreter der Mausspezies *Mus musculus* mit **unterschiedlich langen Lebensspannen** untersucht: die Männchen der beiden **Mauslinien DBA/2 bzw. DBA/1J**. Der Literatur entnommen [45], konnte eine Lebensspanne für die männlichen DBA/2-Mäuse von ca. 107 Wochen verzeichnet werden. Die männlichen DBA/1J-Mäuse wurden mit einer Lebensspanne von ca. 62 Wochen angegeben. Untersucht wurden die Proteinmuster männlicher DBA/2-Mäuse im Alter von ca. 100 Wochen sowie männliche DBA/1J-Mäuse im Alter von ca. 60 Wochen. Dazu wurden für den jeweiligen Mäusestamm auch die Proteinmuster der 14. Woche dargestellt und verglichen. In der Tabelle 39 sind die variablen Spots der miteinander verglichenen Proteinexpressionsmuster der männlichen DBA/2- sowie der DBA/1J-Mäuse wiedergegeben. Die genannten Spotunterschiede umfassen Änderungen der Spotintensität und des Spotvolumens (hochreguliert, herunterreguliert, vorhanden, nicht vorhanden). Es wurden auch die Proteinspots erfasst, die in beiden Vergleichen (vgl. Tabelle 40) eine Veränderung zeigten. Diese werden als „Übergreifend“ angegeben.

Tabelle 40: Spotunterschiede von männlichen DBA/2-Mäusen und DBA/1J-Mäusen.

(Spotunterschiede sind aus der Sicht der DBA/1J erfasst).

Spotprofil	Anzahl variabler Spots: 14. Wo DBA/1J vs. 14. Wo DBA/2	Anzahl variabler Spots: 100 Wo DBA/1J vs. 60.Wo DBA/2
Hochreguliert	4	8
Herunterreguliert	5	10
Vorhanden	-	-
Nicht vorhanden	3	1
Summe	12	19
Übergreifend	3 Proteinspots, die in beiden Vergleichen Veränderungen zeigten	

Tabelle 41: Altersabhängigkeit der variablen Spots der DBA/2-Mäuse und DBA/1J-Mäuse.

Altersabhängigkeit DBA/1J: 14.Wo vs. 60.Wo; Altersabhängigkeit DBA/2: 14. Wo vs. 100.Wo.

Anzahl variabler Spots	Altersabhängigkeit DBA/1J	Altersabhängigkeit DBA/2
DBA/2 vs. DBA/1J (14.Wo): 12 Spots	3	1
DBA/2 vs. DBA/1J (100.Wo, 60.Wo): 31 Spots	2	2

Aus der Tabelle 40 geht hervor, dass die Zahl der Spotunterschiede der Proteinexpressionsmuster der DBA/2- und DBA/1J-Mäuse gering ist. Der Vergleich der Proteinmuster der 14. Woche zeigte 12 Spots, die einen Polymorphismus zwischen den Mäusestämmen DBA/2 und DBA/1 darstellen. Der Vergleich der Proteinmuster der 60. Woche (DBA/1J) und der 100. Woche (DBA/2) zeigte 19 Spots mit einem Polymorphismus. Wenige dieser variablen Spots zeigten eine Altersabhängigkeit (vgl. Tabelle 41). Die Abbildung 34 gibt

einen in seiner Intensität und Volumen auffällig Proteinspot wieder, der als vergrößerter Bildausschnitt dargestellt ist. Dieser dargestellte Proteinspot wurde in seiner Proteinidentität mit der Massenspektrometrie bestimmt.

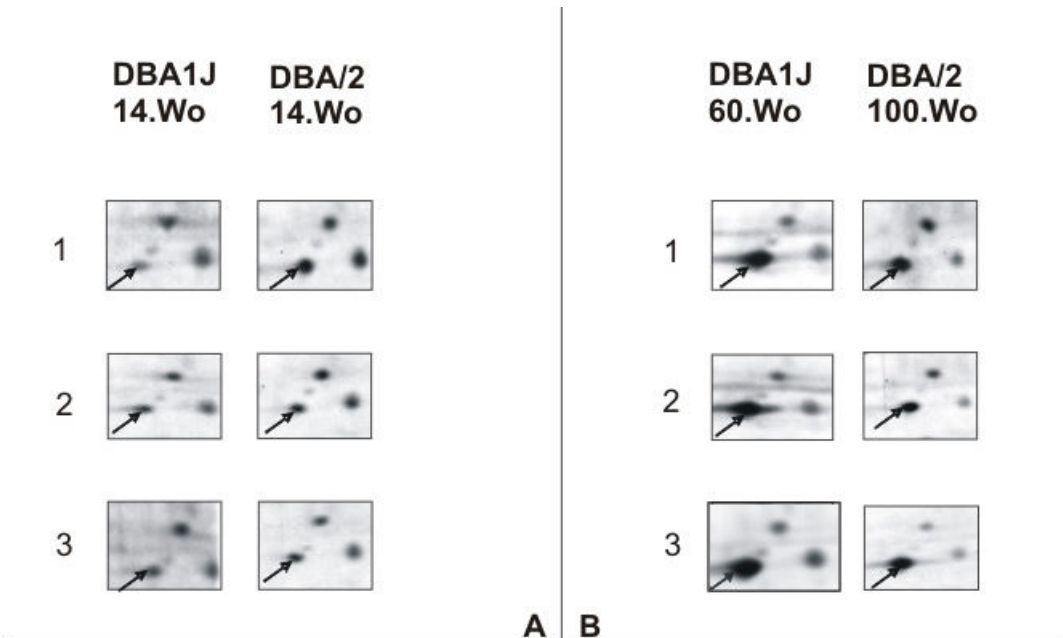


Abbildung 34: Einfluss unterschiedlicher Lebensspannen auf das Proteinexpressionsmuster. A: Vergleich von 3 Gelpaaren des Zeitpunktes der 14. Woche der beiden Mausarten DBA/1J und DBA/2. B: Vergleich von 3 Gelpaaren des Zeitpunktes der 60./100. Woche der beiden Mäusestämme DBA/1J und DBA/2. Markierter Proteinspot wurde als ein Gemisch aus: 1. NADH dehydrogenase-Fe-S-protein 3, MW: 30, pl: 6,7 2. NADH-Oxidoreduktase 30 kDa-subunit, MW: 30, pl: 6,4 identifiziert.

Die Abbildung 34 zeigt einen mit Pfeilen markierten Proteinspot, der in den Proteinexpressionsmuster der beiden genannten Mäusestämme der Zeitpunkte der 14. und 60./ 100. Woche mit unterschiedlich langen Lebensspannen, ein variables Spotprofil aufwies. Der Proteinspot konnte als ein Gemisch aus den Proteinen: 1. NADH-Dehydrogenase-Fe-S-protein 3, MW: 30 kDa, pl: 6,7 2. NADH-Oxidoreduktase 30 kDa-subunit, MW: 30 kDa, pl: 6,4 identifiziert werden. Der Proteinspot war in allen untersuchten Proteinexpressionsmustern vorhanden. Eine Änderung dieses Proteinspots in der Intensität und im Volumen war in den Proteinproteinexpressionsmustern der jeweiligen 14. Woche der DBA/1J- und DBA/2-Mäuse geringfügig festgestellt worden. Dennoch ist ersichtlich, dass die Intensität dieses Proteinspots in den Gelpaaren der DBA/2, 14. Woche stärker ist als in den der DBA/1J, 14. Woche. Es konnte eine Zunahme der Intensität und des Volumens des Proteinspots in

den Proteinmuster der 60./ 100. Woche (DBA/1J versus DBA/2) festgestellt werden. Hierbei war der genannte Proteinspot in den DBA/1J-Mäusen (60. Woche) hochreguliert.