

Aus dem Berliner Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM)
Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Geschlechterunterschiede im kardialen Metabolismus bei
physiologischer Hypertrophie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marjam Rittermann

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek

2. Prof. Dr. med. S. Felix

3. Prof. Dr. med. V. Stangl

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Unterschiedliche Ursachen kardialer Hypertrophie	1
1.3 Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie.....	3
1.4 Rolle des Energiestoffwechsels bei der Herzhypertrophie	4
1.4.1 „Peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs).....	5
1.4.2 PPAR-Kofaktoren und Zielgene	8
1.4.3 Signalwege	9
1.5 Ausdauerleistung im Tiermodell.....	10
1.6 Ziele und Hypothesen der Arbeit	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Chemikalien	12
2.1.3 Puffer.....	13
2.1.4 Antikörper, Enzyme & Sonstiges.....	14
2.1.5 PCR-Primer	14
2.1.6 Software	15
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Tiermodell.....	16
2.2.2 Proteinisolierung	16
2.2.3 Proteinmessung	16
2.2.4 Antikörperoptimierung für das Western Blot-Verfahren.....	17
2.2.5 Proteinbestimmung/Western Blot	17
2.2.6 RNA-Isolierung.....	21
2.2.7 Überprüfung der RNA-Qualität	21
2.2.8 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	22
2.2.9 Charakterisierung der isolierten RNA-Proben mittels Bioanalyzer.....	23
2.2.10 Reverse Transkription	25

2.2.11	Optimierung und Auswahl der Primer für die „real-Time PCR“	26
2.2.12	Real-Time-PCR.....	27
2.2.13	Statistische Auswertung	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Lauftradtraining induziert Myokardhypertrophie	30
3.2	Proteinexpression	31
3.2.1	Proteinexpression PPARs, Kofaktor PGC-1 α und Akt	31
3.3	Genexpression	34
3.3.1	Keine signifikanten Veränderungen bei Genexpression in Fett- und Glukosestoffwechselgenen.....	34
3.3.2	Unveränderte Genexpression der PPARs und des Kofaktors PGC-1 α	34
3.3.3	Expression der Zielgene	35
3.3.4	Genexpression der Glukosetransporter	37
4	Diskussion	38
4.1	Belastungsinduzierte und geschlechtsspezifische Veränderungen bei Lauftradtraining.....	38
4.2	Beobachtete Veränderungen von Proteinexpressionen	39
4.3	Gene und Proteine mit stabiler Expression bei Lauftradtraining ohne Geschlechterunterschiede.....	41
4.4	Geringfügige Expressionsänderungen - Bedeutung des Untersuchungszeitpunktes	46
4.4.1	Wahl der Zielgene	47
4.4.2	Mechanismen der Regulation.....	48
4.4.3	Stoffwechselregulationen durch Enzymaktivitäten anstelle von Gen- und Proteinexpression	49
4.5	Einschränkungen	49
4.6	Bedeutung der Befunde - Schlussfolgerung.....	50
	Zusammenfassung.....	51
	Literaturverzeichnis.....	52
	Danksagung.....	57
	Erklärung.....	58
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Ak.....	Antikörper
APS.....	Ammoniumsulfat
BSA.....	Bovine Serum Albumin Lösung
bp.....	Basenpaare
BZ.....	Belichtungszeit
CCR.....	Center for Cardiovascular Research
CD36.....	”Cluster of differentiation”
cDNA.....	complementary DNA
COX 5 A.....	cytochrome Oxidase 5A
CPT1.....	Carnitine- Palmytoyltransferase 1
Ct-Wert.....	”cycle threshold”
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DNase.....	Desoxyribonuklease
FAO.....	Fettsäureoxidation
FATP.....	”fatty acid transport protein”
FW-Primer.....	Forward- Primer
GAPDH.....	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
Glut 1.....	Glucosetransporter 1
Glut 4.....	Glucosetransporter 4
HPRT.....	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
KDa.....	Kilo Dalton
LCFA.....	long-chain fatty acid
LPL.....	Lipoproteinlipase
M-CAD.....	”Medium-Chain Acyl CoA Dehydrogenase”
mRNA.....	messenger-RNA
NR.....	nuclear receptor
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
PDH.....	Pyruvat-Dehydrogenase Komplex
PGC-1 α	”Peroxisome Proliferators-activated receptor γ coactivator- 1 α ”
PPARs.....	”Peroxisome proliferator-activated receptor family”
RIN.....	RNA Integrity Number
RNA.....	Ribonukleinsäure
RNase.....	Ribonuklease
RT.....	Raumtemperatur
rt-PCR.....	real time PCR
RV-Primer.....	Reverse Primer
RXR.....	9-cis retinoic acid –activated receptor
SDS.....	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TBS-T.....	Tris buffered Saline-Tween
TEMED.....	Tetranethylendiamin
Tris.....	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20.....	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Herzerkrankungen gelten in den westlichen Industrienationen als eine der häufigsten chronischen Erkrankungen mit ungünstiger Prognose und sind oft mit kardialer Hypertrophie assoziiert [1]. Allgemein gilt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen bei Männern und Frauen ab dem 75. Lebensjahr die häufigste Todesursache darstellen. Von Herzinsuffizienz sind ca. 10 % aller 70-jährigen betroffen; ihre Häufigkeit nimmt im Alter stark zu [2]. Insgesamt versterben an den Folgen der Herzinsuffizienz jährlich ca. 38 000 Frauen und 18 000 Männer in Deutschland. Damit stellt die Herzinsuffizienz die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Einer der wichtigsten Vorläufer der Herzinsuffizienz ist die kardiale Hypertrophie [3]. Bekannt ist, dass Frauen besser gegen die Entwicklung einer pathologisch myokardialen Hypertrophie geschützt sind als Männer. Auch konnten molekulare Untersuchungen an Herzen weniger Apoptose und Fibrose bei Frauen als bei gleichaltrigen Männern nachweisen [3, 4].

Eine dauerhafte Beeinträchtigung der Herzfunktion führt zu einer Belastung des Organismus, die mit unterschiedlichsten molekularen Veränderungen im Körper einhergeht [5]. Durch diese Veränderungen kann eine Adaptation des Organismus an eine erhöhte Arbeitsleistung mit einem gleichzeitig geringeren Sauerstoffangebot beobachtet werden. Zahlreiche, sich untereinander beeinflussende Stoffwechselwege und Transkriptionsfaktoren sind in diese Vorgänge involviert [6]. Gründe für diese Veränderungen können pathologische Vorgänge sein, wie z.B. Entzündungen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, aber auch physiologische Stimuli wie beispielsweise der Ausdauersport kommen dafür in Frage. Ebenso verschieden wie die Stimuli sind auch die molekularbiologischen Veränderungen. Diese treten innerhalb des Zellzyklus, der Zellstruktur, der intrazellulären Signalwege, der Proteinsynthese und des kardialen Stoffwechsels auf [6].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den speziellen Veränderungen von Faktoren des Fett- und Glukosestoffwechsels in physiologisch hypertrophierten Herzen von Mäusen. Dabei soll besonders auf geschlechtsspezifische Unterschiede eingegangen werden.

1.2 Unterschiedliche Ursachen kardialer Hypertrophie

Kurz nach der Geburt eines Menschen werden Herzmuskelzellen im Körper postmitotisch. In Folge dessen ist eine Zunahme der Zellzahl (Hyperplasie) nicht mehr möglich. Bei einer

dauerhaften Mehrbelastung werden die Kardiomyozyten deshalb größer, und die Masse des Herzmuskels nimmt zu (Hypertrophie) [7]. Man unterscheidet drei Formen des kardialen Wachstums: normales Wachstum der Myozyten (Eutrophie), Wachstum der Myozyten durch physiologische Stimuli, wie z.B. durch Ausdauersport (physiologische Hypertrophie) und stimuliertes Wachstum durch pathologische Belastung (pathologische Hypertrophie) [8, 9]. Der häufigste Grund für eine pathologische Hypertrophie ist der Bluthochdruck [9]. Der häufigste Grund für eine physiologische Hypertrophie ist die Folge eines Ausdauertrainings („athletisches Herz“) [10]. Die Hypertrophie stellt eine Adaptation des Organismus an die veränderten Belastungen dar, wobei der Körper versucht, das Herzzeitvolumen weiter zu fördern. Auch durch eine Schwangerschaft kann das Herz physiologisch vergrößert werden [4, 11]. Die physiologische Hypertrophie ist reversibel.

Eine Myokardhypertrophie ist auch häufig die Folge von Herzerkrankungen, wie zum Beispiel Bluthochdruck und Aortenstenose. Sie selbst ist hier ein ungünstiges prognostisches Zeichen und gilt als einer der wichtigsten Vorläufer der Herzinsuffizienz [12]. Angesichts der demographischen Entwicklung in der Bevölkerung wird dieses Leiden in Zukunft, insbesondere in Deutschland, weiterhin an Bedeutung gewinnen.

Es ist bereits bekannt, dass den Hypertrophieformen nicht nur verschiedene Ursachen zu Grunde liegen, sondern dass sie auch molekularbiologische Differenzen aufweisen [5, 6]. So konnten molekularbiologische Analysen Unterschiede in der Genexpression pathologischer und physiologischer Hypertrophie aufzeigen [6]. Die Ergebnisse zeigten dabei, dass in der pathologischen und in der physiologischen Hypertrophie unterschiedliche Gengruppen reguliert wurden. Zu den Genen, die in der pathologischen Hypertrophie reguliert wurden, zählten: inflammatorische Gene und Gene, die Antworten auf Stresseinflüsse unterstützen. Die regulierten Gene in der physiologischen Hypertrophie waren überwiegend in den Metabolismus und das Zellwachstum involviert. Der Organismus passt sich so einem physiologischen Wachstum an und stimuliert sein Zellwachstum entsprechend der Mehrbelastung [6]. Die Entwicklung der Herzinsuffizienz wird von makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Herzstruktur begleitet, es kommt zu einem „kardialen Remodeling“ [9]. Bei Druckbelastung durch Bluthochdruck oder Aortenstenose wird eine Zunahme der Wanddicke beobachtet. Man spricht von einer konzentrischen Hypertrophie. Wird die Druckbelastung nicht verringert, geht diese konzentrische Hypertrophie in die Herzinsuffizienz über, deren Merkmale die Dilatation und ein Kontraktilitätsverlust des linken Ventrikels sind [13].

Pathologische Stimuli lösen eine oxidative Stress-Antwort aus, was bei der physiologischen Hypertrophie nicht der Fall ist [6]. Da eine Ausdauerbelastung mit erworbener, physiologischer

kardialer Hypertrophie das metabolische Gleichgewicht nicht beeinflusst, ist ein „Switch“ vom Fettstoffwechsel zum Glucosestoffwechsel wie in der pathologischen Hypertrophie [14] nicht anzunehmen.

1.3 Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie

Es ist bekannt, dass es Geschlechterunterschiede in den Risikofaktoren für Entwicklung, Verlauf und Ausprägung der Myokardhypertrophie gibt. Männer scheinen insgesamt eine stärkere Ausprägung der kardialen Hypertrophie zu haben als Frauen, selbst wenn das höhere Körpergewicht nicht mit einbezogen wird [9]. Geschlechtsspezifische Unterschiede gelten dabei sowohl für die Entwicklung einer physiologischen als auch für die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie [3, 15].

So konnten Untersuchungen an Ratten bei einer physiologisch verursachten Hypertrophie ein beschleunigtes signifikantes Ventrikelwachstum bei weiblichen Tieren bereits nach wenigen Tagen des Trainings zeigen. Anschließend verlief die kontinuierliche Zunahme des Ventrikelgewichtes konform mit dem Ventrikelgewicht der nicht belasteten Kontrollgruppe [15]. Im Vergleich dazu unterlag bei einem Tiermodell mit spontanhypertensiven Ratten die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie bei den männlichen Tieren einem scheinbar genetischen und altersabhängigen Prozess. So zeigten die männlichen Tiere hier ein frühzeitig vergrößertes Ventrikelgewicht und entwickelten im Alter von zwei Monaten einen Hochdruck und ein deutliches Herzversagen nach 14-21 Monaten [15]. Bei den weiblichen spontanhypertensiven Tieren konnte eine geringere Beeinträchtigung der Herzfunktion vermerkt werden. Diese Untersuchungen zeigten damit, dass weibliche Tiere eine deutliche ausdauerleistungsabhängige Myokardhypertrophie entwickelten und insgesamt später als die männlichen Tiere eine Beeinträchtigung der Herzfunktion entwickelten [15].

Auch Untersuchungen zur Genexpression bei pathologischer Hypertrophie zeigen geschlechtsspezifische Unterschiede [3]. So zeigten sich unterschiedliche Genexpressionen des kardialen Stoffwechsels bei weiblichen und männlichen Mäusen nach Aortenkonstriktion [3]. Insgesamt geben diese Ergebnisse Hinweise für Erklärungen zur unterschiedlichen Ausprägung von Herzerkrankungen und Herzversagen bei den Geschlechtern.

1.4 Rolle des Energiestoffwechsels bei der Herzhypertrophie

Das adulte gesunde Herz deckt den größten Teil seines Energiebedarfs (60-70%) über den Fettstoffwechsel [16]. Substrate sind v.a. Fettsäuren, die sich von frei zirkulierenden triglyceridreichen Lipoproteinen ableiten. Aber auch eine alternative Energiegewinnung über andere Substrate wie Glukose und Laktat ist möglich [17]. Fettsäuren werden über die β -Oxidation verstoffwechselt. Das Substrat Pyruvat hingegen, abgeleitet von Glukose, und ebenso das Substrat Laktat werden über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH) zu ATP verarbeitet. Beide Vorgänge sind an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die dafür entsprechenden Enzyme des Mitochondriums sind über nukleäre und mitochondriale Gene verschlüsselt [17].

Der kardiale Energiestoffwechsel in der physiologischen Hypertrophie ist derzeit noch nicht so gut untersucht wie in der pathologischen Hypertrophie. Es konnten aber bereits Änderungen der Transkription von mitochondrialen Genen in physiologisch erworbener Hypertrophie beobachtet werden [15]. Diese Änderungen scheinen zu einer kardialen Funktion beizutragen, die nicht mit vermehrten fibrotischen Prozessen und kardialer Dysfunktion im Zusammenhang steht [18]. Auch wurde dabei kein Wechsel der Energiegewinnung vom Fett- zum Glucosestoffwechsel festgestellt, und Untersuchungen zeigten eine durchaus günstige Adaptation an die Mehrbelastung bei physiologischer Hypertrophie [19].

Eine Beeinträchtigung der Fettsäureoxidation mit einer gleichzeitigen Umschaltung zur vermehrten Glukoseverstoffwechslung ist hingegen ein Marker des Herzversagens [20]. Studien an Säugetieren einschließlich des Menschen zeigten am pathologisch vergrößerten Herzen eine Verminderung des Fettsäurestoffwechsels und einen verstärkten Glukosestoffwechsel, was normalerweise dem fetalen Stoffwechsel entspricht [9, 21]. So steigert sich anfänglich die Glukosenutzung über die Glykolyse. Dabei entsteht eine Dysbalance in der Energiegewinnung [19]. Dies ist eine langfristig ungünstige aber vorläufige Kompensation des Körpers an die veränderten Bedingungen (vermindertes Sauerstoffangebot, erhöhter enddiastolischer Druck etc.), die bei einem Herzleiden existieren [5, 22]. Solche Ereignisse werden im myokardialen Energiestoffwechsel bei kardialer Hypertrophie und ebenso bei der Herzinsuffizienz beobachtet [23]. Die ganze Tragweite von langfristigen Folgen einer Beeinträchtigung der Fettsäureoxidation ist derzeit noch nicht ausreichend geklärt [24].

1.4.1 „*Peroxisome proliferator-activated receptors*“ (PPARs)

Zu den elementaren Regulatoren des Fettstoffwechsels im Herzen gehören die „peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs). PPARs gehören zur Familie der nukleären Transkriptionsfaktoren. Es existieren drei Isoformen: PPAR α , β/δ und γ [25, 26]. PPARs werden ligandenabhängig, z.B. endogen über Fettsäuren aktiviert [27] und stellen die primären Regulatoren des Fettstoffwechsels im Herzen dar [17, 23]. PPARs besitzen eine DNA-bindende Domäne und eine ligandenbindende Domäne [28]. Aktivierte PPARs dimerisieren mit dem „*9-cis retinoic acid-activated receptor*“, RXR. Dies ermöglicht die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen und somit die Aktivierung der jeweiligen PPAR-Zielgene. Als Aktivatoren wirken natürliche Liganden, wie die oben genannten freien Fettsäuren, aber auch Eicosanoide und Arachidonsäurederivate. Es kommen auch synthetische Stoffe wie z.B. Fibrate in Betracht, die auch für eine medikamentöse Behandlung eingesetzt werden [17].

PPARs sind entscheidend an der Regulation des Fett- und Glukosestoffwechsels beteiligt [25]. Man geht davon aus, dass die Regulation der PPARs und ihrer Kofaktoren bei dem „Switch“, vom Fettstoffwechsel hin zum Glukosestoffwechsel, wie es bei der pathologischen Hypertrophie der Fall ist, eine Schlüsselrolle spielt [29]. Bekannt ist, dass es in einem physiologisch hypertrophierten Herzen ebenfalls zu Änderungen innerhalb des Stoffwechsels kommt [15]. So konnten einige Veränderungen der Expressionen innerhalb mitochondrialer Proteine bei physiologischer Hypertrophie festgestellt werden [15]. Watson et.al. zeigten in diesem Zusammenhang eine signifikante Steigerung der Proteinexpression des PPAR-Kofaktors PGC-1 α nach Ausdauertraining [15].

PPAR α

Ursprünglich galt PPAR α als Zielrezeptor für fettsenkende Medikamente (Fibrate) und krebserzeugende Stoffe [20]. PPAR α ist einer der primären Regulatoren des Fettsäuremetabolismus im Herzen. Er kommt in allen Geweben mit einem starken oxidativen Stoffwechsel, wie Herz, Leber, Niere und braunem Fettgewebe vor [23, 25]. Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Regulation einer großen Anzahl von Zielgenen, die in die zelluläre Lipidaufnahme involviert sind, beteiligt [26]. Im Herzmuskel reguliert PPAR α die Expression von Genen, deren Produkte in den zellulären Fettsäuremetabolismus involviert sind: der Fettsäuretransport und die Veresterung von Fetten, der Import von Fettsäuren in das Mitochondrium sowie die mitochondriale und peroxisomale Fettsäureoxidation [14]. In diesem Zusammenhang zeigten Huss et. al. in einem Tierversuch mit PPAR α -defizienten Mäusen eine

massive Störung der Fettsäureoxidation. Die Aufnahme von freien Fettsäuren war dabei so verändert, dass sich die Rate der Glukoseoxidation um ein Vielfaches steigerte. Weiterhin konnte eine massive intrazelluläre Lipidakkumulation im Herzen beobachtet werden, die zur Lipotoxizität führte [9, 17]. Forciert wurde die Energiegewinnung dabei über den Glukosestoffwechsel. Eine gesteigerte Glut4-Expression konnte ebenfalls beobachtet werden [23].

PPAR α weist auch anti-inflammatorische Eigenschaften auf. So untersuchten Flavell et.al in einer klinischen Studie an Männern den Zusammenhang zwischen einer Genvariation von PPAR α und dem Entstehen von Arteriosklerose und der ischämischen Herzerkrankung. Dabei konnte ein Fortschreiten der Erkrankungen mit einem Gendefekt von PPAR α in Verbindung gebracht werden [30].

PPAR β/δ

PPAR β/δ kommt ubiquitär im Organismus vor [23]. Besonders aktiv ist dieser nukleäre Rezeptor im Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur und im Herzgewebe. Im Herzgewebe beeinflusst PPAR β/δ die Kontraktilität sowie den Transport von Fettsäuren und deren Oxidation.

Neben PPAR α ist PPAR β/δ der primäre Regulator des kardialen Fettstoffwechsels [26]. Des Weiteren führt die Aktivierung von PPAR β/δ zu anti-inflammatorischen Effekten, da er die Aktivität von Makrophagen vermindert [20]. Nach Barish et al. kommt es bei einer Inaktivierung von PPAR β/δ im Herzen zu einer verminderten Produktion von Genen der β -Oxidation [20]. Dies zieht eine verminderte Fettsäureoxidation und eine erhöhte Glukoseverstoffwechslung nach sich mit einer gleichzeitigen Lipidakkumulation in den Kardiomyozyten. Herzen von PPAR β/δ „knock-out“ Mäusen zeigen eine verminderte Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit. Stattdessen haben sie einen erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck und eine verminderte kardiale Austreibungskraft. [20].

PPAR γ

PPAR γ ist einer der wichtigsten Regulatoren im Fettgewebe [31]. Hier stimuliert er die Differenzierung von Adipozyten [32], die Steuerung der Abgabe von Fettsäuren aus Lipoproteinen und deren anschließende Aufnahme zur Energiespeicherung in den Fettzellen [33, 34]. Bekannt ist, dass die Expression, insbesondere postprandial, am stärksten im Fettgewebe ist. Im Fettgewebe steigert PPAR γ die Hydrolyse von Fetten über die Lipoproteinlipase, sowie die Aufnahme dieser über das „fatty acid transport protein“ (FATP) und über CD36, einen Transporter von langkettigen Fettsäuren [35]. Die Glukoseaufnahme und Triglycerinsynthese

werden ebenfalls aktiviert, wodurch Fett gespeichert wird und Fettsäuren und Serumglukose vermindert werden [31]. Der kardiale Fettstoffwechsel wird damit durch regulatorische Prozesse am extrakardialen Gewebe beeinflusst [31]. Auch außerhalb des adipösen Gewebes, wie in Gefäßwänden, im Skelett- und Herzmuskel konnte PPAR γ nachgewiesen werden [25]. Die Expression von PPAR γ im Myokard liegt jedoch deutlich unter den Expressionsraten der anderen PPARs [31]. Des Weiteren mindert die Anwesenheit von PPAR γ ebenfalls wie die von PPAR α die Entstehung von kardialen Fibrose-Prozessen [25].

PPAR(-Kofaktoren) und Geschlechterunterschiede

Experimentelle Arbeiten belegen den Einfluss von geschlechtsspezifischen Hormonen auf Signalkaskaden. Insbesondere scheint das Sexualhormon Östrogen dabei eine entscheidende Bedeutung für die Serin-Threoninkinase (Akt), für die PPARs und ihren Kofaktor PGC-1 α zu besitzen [4, 19, 36].

So ergaben Untersuchungen an Mäusen, in denen der Transkriptionsfaktor PPAR α ausgeschaltet wurde, eine massive kardiale und intrahepatische Lipidakkumulation. Dabei verstarben 100 % der männlichen Tiere, wohingegen bei den weiblichen Tieren nur eine Mortalitätsrate von 25% beobachtet wurde [37]. Nach einer Behandlung der männlichen Tiere mit β -Estradiol zeigten diese die gleiche niedrige Mortalität wie die weiblichen Tiere [37].

Diese Beobachtungen und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [4, 36] belegen, dass Hormone, insbesondere das Sexualhormon Östrogen, Einfluss auf Signalwege innerhalb des Fett- und Glukosestoffwechsels besitzen. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine Aktivierung von Zielgenen über PPAR α und Östrogenrezeptoren [4, 37].

In diesem Zusammenhang zeigten Flavell et al. bei einem Gendefekt von PPAR α (G/C Polymorphismus auf Intron7) eine deutliche Zunahme der kardialen Masse nach Ausdauertraining [19]. Dabei konnte ein Geschlechterunterschied festgestellt werden. Männer zeigten eine signifikante kardiale Hypertrophie, Frauen hingegen zeigten ähnliche Tendenzen, aber eine deutlich geringere Ausprägung [19]. Zusätzliche Untersuchungen eines Mausmodells belegen dabei den kardioprotektiven Einfluss von β -Estradiol, was die Unterschiede zwischen den Geschlechtern begründet [19]. Auch die Genexpression des Transkriptionsfaktor PGC-1 α wird über Östrogenrezeptoren reguliert [36]. Murphy et al. zeigten des Weiteren, dass weibliche Mäuse verbesserte Regenerationsbedingungen und weniger Nekroseareale nach Ischämien zeigen, was sich nach Ausschaltung der Östrogenrezeptoren zu vermindern scheint [36].

1.4.2 PPAR-Kofaktoren und Zielgene

”Peroxisome Proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α ” (PGC-1 α)

PGC-1 α gehört der Familie der PPAR-Koaktivatoren an. Von diesen ist bekannt, dass sie induzierbare Faktoren von verschiedenen nukleären Rezeptoren darstellen, die den Energiestoffwechsel beeinflussen. PGC-1 α findet sich verstärkt in Geweben mit zahlreichen Mitochondrien und hohem Sauerstoffverbrauch, wie z.B. im Herzen, in quergestreifter Skelettmuskulatur und im braunen embryonalen Fettgewebe [14, 17, 38].

Bekannt ist auch, dass der Kofaktor entscheidend zur Regulation und Funktion von kontraktile Vorgängen des Herzmuskels und der Stoffwechsellage beiträgt [15]. So unterstützt er die mitochondriale Biogenese [38] und aktiviert weitere Kernrezeptoren, wie z.B. PPAR α [39]. Man geht ebenfalls davon aus, dass PGC-1 α in die Energiestoffwechselfvorgänge während der Entwicklung und in Antwort auf physiologische Stimuli, wie z.B. nach sportlicher Ausdauerbetätigung, involviert ist [40]. So zeigten Untersuchungen im Tiermodell eine deutlich gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors in einem durch Ausdauerleistung stimulierten, physiologisch hypertrophen Myokardgewebe [15, 34].

Bekannt ist auch, dass die Genexpression von PGC-1 α durch Östrogenrezeptoren reguliert wird [36, 38]. Dabei zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass Östrogenrezeptoren Einfluss auf Stoffwechselwege besitzen und einen kardioprotektiven Einfluss besonders auf das weibliche Geschlecht ausüben [4, 36, 38]. Ebenfalls zeigte sich, dass nach Traumaverletzungen männliche Tiere PGC-1 α vermindert exprimierten, was mit einem Absinken der ATP-Niveaus einherging. Dieser Effekt wurde durch Behandlung mit Östrogen wieder gemindert [38], wodurch es zu verbesserten Heilungsprozessen kam.

Zielgene des Fettstoffwechsels

PPARs werden durch unterschiedliche endogene und exogene Liganden aktiviert [27]. Nach der Bindung von Liganden, z.B. durch Fettsäuren, kommt es zu einer Bindung an den nukleären RXR α -Rezeptor und zur Bildung eines heterogenen Komplexes. Dieser besteht aus PPARs und Kofaktoren und führt zur Bindung an „PPAR response elements“ (PPRE), welche spezifische Promoterregionen von Zielgenen darstellen [29, 31]. Es ist anzunehmen, dass eine gesteigerte Aktivierung der PPARs die Genexpression der Zielgene beeinflusst. Zentrale Zielgene sind unter anderem die Gene Lipoproteinlipase (LPL) und das „Cluster of differentiation“ (CD36), welche die Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle katalysieren [31], sowie in der mitochondrialen/peroxisomalen β -Oxidation die „Medium-Chain Acyl CoA Dehydrogenase“

(MCAD), die „*Carnitine- Palmytoyltransferase 1*“(CPT1) sowie die „*cytochrome Oxidase 5A*“ (COX5A) [31].

Glukosetransporter

Glukosetransporter („Gluts“) sind transmembranständige Transportproteine, die den Transport von Glukose durch die Zellmembran gewährleisten [41]. Bislang sind 14 verschiedene Glukosetransporter bekannt. Um einen Eindruck vom Glukosestoffwechsel zu gewinnen, wurden die Glukosetransporter 1 und 4 im Myokardgewebe untersucht.

Der Transporter Glut1 ist der am weitesten verbreitete Glukosetransporter und kommt ubiquitär in vielen Säugetierzellen vor. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur, wo Glut1 in der perineuralen Hülle des Muskels vorkommt, liegt der Transporter im Myokard signifikant exprimiert vor und ist dort für die basale Versorgung der Myozyten mit Glukose verantwortlich [42]. Im Gegensatz zum Glut4 ist der Transporter Glut1 insulinunabhängig.

Glut4 ist ein insulinabhängiger Transporter. Er wird ausschließlich in Fettgewebe, Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert [43]. Der Transporter ist für die Regulierbarkeit der Glukoseaufnahme durch Insulin in den Geweben verantwortlich [41, 44]. Glut4 befindet sich sowohl in der Plasmamembran, als auch in Form von Vesikeln im Zytosol [41]. Eine basale Grundversorgung durch Glukose über den Transporter ist auch bei einem Zustand der Nahrungskarenz gesichert. Die maximale Stimulation des Glukosetransportes aber wird bei hoher Insulinausschüttung und körperlicher Aktivität erreicht [45]. Dabei beobachteten Slot et al., dass ein verstärkter Glukosetransport in Myokardzellen zu einer Translokation des Transportes von intrazellulär zur Plasmamembran führt [45]. Bekannt ist auch, dass Herzmuskelgewebe mit einer übermäßigen Expression von Glut4 eine signifikant höhere Glukoseaufnahme haben und verstärkt Glykolyse betreiben [46].

1.4.3 Signalwege

Akt, oder auch Proteinkinase B genannt, ist eine Serin-Threoninkinase, die in den verschiedensten Zelltypen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum, Überleben, Metabolismus sowie bei Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen spielt [10, 47]. In Säugetieren sind drei Isoformen von Akt bekannt: Akt1/2/3 [10]. Diese werden durch drei verschiedene Gene kodiert und besitzen eine sehr hohe Sequenzhomologie. Aktiviert wird die Kinase durch Phosphorylierung eines Serin- sowie Threoninrestes zu p-Akt. Die Kinase Akt wird für die Induktion der Glukosetransporter 1/3, sowie für die zelluläre Translokation des

Glukosetransporters 4 benötigt [48]. Bekannt ist auch, dass die „Akt“-Aktivität als Antwort auf zahlreiche Einflüsse z.B. durch Hormone, aber auch in Zusammenhang mit physiologischem Ausdauertraining gesteigert ist [49]. Die Isoformen Akt1/3 scheinen ausschlaggebend für physiologisches Wachstum in Antwort auf Ausdauertraining zu sein und der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie entgegenzuwirken [10, 48]. Der genaue Mechanismus hierbei ist noch ungeklärt. Die phosphorylierte Form von Akt ist in Herzen von jungen Frauen, verglichen mit einer männlichen Gruppe und mit Frauen nach der Menopause, in einem erhöhten Maße vorhanden [47, 50]. Ebenfalls scheinen durch Akt beeinflusste nukleäre Faktoren in Frauen stärker exprimiert zu sein als in Männern [47].

1.5 Ausdauerleistung im Tiermodell

Tiermodelle sind in der medizinischen Forschung etabliert. Man geht davon aus, dass diese als Modelle in ausgewählten Situationen zum Verständnis für den humanen Organismus herangezogen werden können. In dieser Arbeit wurden C57BL/6J Mäuse zu einem freiwilligen Lauftraining durch ein in jedem Käfig separat vorhandenes Laufrad animiert. Den Tieren war es damit möglich eigeninitiativ zu wählen, wann und wie lange sie liefen. Sie wurden weder durch Umweltbedingungen, wie z.B. veränderte Lichteinflüsse noch durch Stimulationen über Strom dazu animiert. Die körperliche Betätigung mit der sich anschließenden Hypertrophie kam deshalb ohne den Einfluss von stress- belasteten Bedingungen und Reizen zustande. Sie wurde bewusst gewählt, um eine möglichst ähnliche Situation wie bei normaler sportlicher Betätigung darzustellen und keine Beeinflussung durch Stressfaktoren zu haben. Dieser Tierversuch unterscheidet sich in diesem Punkt von einem großen Teil an Ergebnissen bekannter Arbeiten, da die Mehrzahl dieser Ausdauerleistungs-Tiermodelle jene Faktoren nicht ausschließt. In der Diskussion der Ergebnisse wird darauf eingegangen.

1.6 Ziele und Hypothesen der Arbeit

Diese Arbeit untersucht Geschlechterunterschiede im kardialen Stoffwechsel im Zuge der Entwicklung einer physiologischen linksventrikulären Hypertrophie durch freiwilliges Lauftraining im Tiermodell. Da der „Switch“ vom Fettstoffwechsel hin zum Glucosestoffwechsel als kardialer Energieproduzent ein Merkmal der pathologischen Hypertrophie ist, wird angenommen, dass es in den Herzen der trainierten Mäuse zu einer Steigerung des Fettstoffwechsels zur Deckung eines moderat erhöhten Energiebedarfs kommt.

Weiterhin soll untersucht werden, ob sich männliche und weibliche Tiere in der Protein- und Genexpression von Faktoren des kardialen Metabolismus unterscheiden. Untersucht wurde dies bereits an mit Ausdauerleistung stressinduzierten Tiermodellen [50-52].

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Auswertung der Ergebnisse der “Peroxisome proliferator-activated receptor family” (PPARs) und deren Kofaktor PGC-1 α . Dabei wird von einem moderaten Anstieg, angepasst an die Ausdauerleistung, ausgegangen. Da Akt, PPAR und der Kofaktor PGC-1 α geschlechtsspezifisch über Östrogenrezeptoren reguliert werden [4, 36], werden auch in diesem Versuchsaufbau Geschlechterunterschiede in der Gen- und/oder Proteinexpression erwartet.

Weiterhin wurden einige der wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Fettsäureoxidation und einige Glukosetransporter untersucht. Sie sollen als die Regulatoren der Fettsäureoxidation einen Eindruck über eventuelle Veränderungen bei physiologischer Hypertrophie geben.

Ausgehend von einem gesteigerten Fettstoffwechsel wird eine entsprechend gesteigerte Rate der untersuchten Transkriptionsfaktoren des Fettsäurestoffwechsels erwartet. Eine gesteigerte Transkription der Glukosetransporter wird hingegen nicht angenommen, da die Energiegewinnung bei Ausdauerleistung nicht verstärkt über die Glykolyse kompensiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Abzug	Köttermann
Auto-Pipette „Acu Jet“	Brand
Autoklav „2540EL“ & „V150“	Systec
Bioanalyzer (RNA 6000 Nano Assay)	Agilent 2100
Eismaschine „AF200“	Scotsman Thermocycler
Elektrophoresekammern	GIBCO
Elektrophoresespannungsquellen	Pharmacia Biotech, Life Tech
Entwicklungsmaschine Curix60	Agfa
Feinwaage	Sartorius
Filterpapier	Schleider u.Schuell
Folie	Saran
Heizblock „TCR100“	ROTH
Kühlraum	Wiessmann
Kühlschränke	Liebherr, Thalheimer
Lysis Matrix D	Q-Biogene
Nitrozellulosemembran	Hybond, Biosciences
Pipetten	Eppendorf, Labsys, Pipetman
Rührer	Ikamag
Schüttelinkubator „3033“	GFL
Schwenktisch „Rocky“	Biometra
Taqman ABI 7000	Applied Biosystems
Tischzentrifugen	Eppendorf
Vortexer „VF2“	Janke & Kunkel
Waage	Kern
Wecker	Roth
Western Blot Apparaturen	Biorad
Zentrifugen	Hettich, VWR, Kendro

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien unterlagen dem Reinheitsgrad pro analysi.

APS	Roth
Blocking Reagenz	Roth
BSA	Sigma
Chemilumineszenz	GE Healthcare
Chloroform	Roth
DEPC-H ₂ O	Sigma
Ethanol	Roth
Glycin	Roth
HCl	Roth
HPLC Millipore	Reinwasseranlage
Isopropanol	Roth

Methanol	Prolabo
Milchpulver	Glücksklee
Nukleotide (dCTP, dUTP, dATP, dGTP)	Thermoelektron
PonceauS-Solution	Sigma
Random-Primer	Invitrogen
Reagenzien/Chip Messung	Ambion
Rotiphorese Gel 30/Acrylamidmix	Roth
RNAzol/RNABee	Tell Test
RNAseOut	Invitrogen
SDS	Roth
Superscript	Invitrogen
SYBR green I nucleic acid gel staining	Sigma
Temed	Roth
Transkriptionspuffer (5x)	Promega
Tween20 (Polysorbat)	Merck

2.1.3 Puffer

Bezeichnung	Pufferzusammensetzung
Coomassie-Brilliant Blue	0,25 g Brilliant Blue in Methanol
Coomassie-Entfärber	45 % Methanol 45 % H ₂ O 10 % Essigsäure
Elektrophoresepuffer 5x	15,1g TRIS Base 94,0g Glycin 50ml 10 % SDS ad 1000 ml H ₂ O (pH 8,3)
Glycin Stripping Puffer	1,876 g Glycin 100 ml 10 % SDS H ₂ O ad 1000 ml (pH2)
Membrane blocking agent (5%)	5g low fat dried milk , 100 ml TBS-T (0,1% Tween)
Protein-Extraktionspuffer	10 mM Tris, pH7,5 140 mM NaCl 1 mM EDTA 25 % Glycerol 0,5 % SDS 0,5 % Nonident P-40 Immer frisch ansetzen auf 1ml: 0,1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 100 ng/ml Proteaseinhibitor Cocktail (PIC)
Transferpuffer (4x)	144,2 g Glycin, 30,3 g TRIS Base, ad 2 l H ₂ O

Bezeichnung	Pufferzusammensetzung
TBS-T (5x)	12,1 g TRIS Base 40 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,6) +0,1 % TWEEN 20
TRIS (1 M, pH 7,6)	60g TRIS, ad 500 ml H ₂ O

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen Puffer für das Western Blot-Verfahren.

2.1.4 Antikörper, Enzyme & Sonstiges

Produkt	Firma
Anti-PPAR alpha	Santa Cruz
Anti-PPAR beta, delta	Santa Cruz
Anti-PPAR gamma	Santa Cruz
Anti-PGC 1 α	Santa Cruz
Anti-GAPDH	Dianova
Anti-AKT	Santa Cruz
Anti-P-AKT	Santa Cruz
Superscript Reverse-Transkriptase	Invitrogen
SYBR green I nucleic acid gel staining	Sigma

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper sowie Substanzen für die RT-PCR.

2.1.5 PCR-Primer

Zielgen	Sequenz	Fragmentlänge	Tag-Man Bedingung	Primerverhältnis
mm-HPRT	F5' - GCT TTC CCT GGT TAA GCA GTA CA-3' R5' - ACA CTT CGA GAG GTC CTT TTC AC-3'	78 bp	15" 95°C 1' 60°C	1:1
mm-PPAR alpha	F5' - CAG GGT ACC ACT ACG GAG TTC AC-3' R5' - GCA GCT CCG ATC ACA CTT GTC-3'	101 bp	15" 95°C 1' 60°C	3:1
mm-PPAR beta,delta	F5' - GAA GTG GCC ATG GGT GAC-3' R5' - GGA GGA ATT CTG GGA GAG GT-3'	96 bp	15" 95°C 1' 60°C	1:3
mm-PPAR gamma	F5'-CCG AAG AAC CAT CCG ATT GA-3' R5'-ATC TCC GCC AAC AGC TTC TC-3'	186 bp	15" 95°C 1' 60°C	1:1
mm-CPT1	F5'-TGT GAG TGA CTG GTG GGA AG-3' R5'-GCT GCT TGC ACA TTT GTG TT-3'	117 bp	15" 95°C 1' 62,5°C	3:1
mm-CD36	F5' - CCT CTG ACA TTT GCA GGT CCA T-3' R5'-AAA CAG TGG TIG TCT GGG TTC TG-3'	133 bp	15" 95°C 1' 60°C	1:1
mm-Glut 1	F5'-TTG TTG TAG AGC GAG CTG GA-3' R5'-TTC AAA GAA GGC CAC AAA GC-3'	164 bp	15" 95°C 1' 60°C	1:3
mm-Glut 4	F5'-GTC GGG TTT CCA GCA GAT-3' R5'-GGC ATT GAT AAC CCC AAT GT-3'	136 bp	15" 95°C 1' 57°C	1:1

Zielgen	Sequenz	Frag- ment- länge	Tag-Man Bedingung	Primer- verhält- nis
mm-MCAD	F5'-CAG ATT TTC GGA GGC TAT GGA TT-3' R5'-ACG AGC TAT GAT CAG CCT CTG AA-3'	219 bp	15" 95°C 1' 60°C	3:1
mm-COX5A	F5'-TTA AAT GAA TTG GGA ATC TCC AC-3' R5'-GTC CTT AGG AAG CCC ATC G-3'	81 bp	15" 95°C 1' 60°C	3:1
mm-LPL	F5'- GCC AAG AGA AGC AGC AAG AT-3' R5'- CCA TCC TCA GTC CCA GAA AA-3'	101bp	15" 95°C 1' 60°C	1:1
mm-PGC-1 α	F5'-GAA AGG GCC AAA CAG AGA GA-3' R5'-GTA AAT CAC ACG GCG CTC TT-3'	63 bp	15" 95°C 1' 60°C	1:1

Tabelle 3: Übersicht der Oligonukleotidsequenzen.

2.1.6 Software

System	Firma
ABI 7000 Software	Applied Biosystems
Acrobat Reader	Adobe
AlphaEaseFC	Adobe
Endnote	Thomson ICI Research
Office 2003 (Word, Excel, Power Point)	Microsoft
Photoshop 7.0	Adobe
SPSS for Windows 13.0	SPSS Inc.
Sigma Plot	Systat Software

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Softwareprogramme.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

96-well-Platte "Reaction Plate"	Applied Biosystems
96-well-Platte "Micro Amp Optical Tubes"	Applied Biosystems
Optical Adhesive Film "Micro Amp"	Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell

Für die Untersuchungen an den Herzen der C57BL/6J Mäuse wurden je 30 männliche und 30 weibliche Tiere im Alter von sieben Wochen von der Firma Harlan Winkelmann bezogen und zu den üblichen tiermedizinischen Standardbedingungen im Tierstall des „Center for Cardiovascular Research“ (CCR) gehalten (TV 0148/06). Die Tierhaltung und die Tierexperimente wurden durch das Komitee für den Tierschutz an der Charité, Universitätsmedizin Berlin geprüft und anhand der Vorgaben der GV-SOLAS und der FELASA durchgeführt.

Alle Tiere bekamen Standardfutter und Wasser „ad libitum“. Der Tag-und-Nacht-Zyklus betrug 12 Stunden. Alle Tiere wurden in separaten Käfigen gehalten, wobei die Kontrollgruppe und die Running- Gruppe bis auf das in jedem Käfig installierte Laufrad bei der Running-Gruppe identische Haltungsbedingungen hatten. Die Laufperiode betrug 5 Wochen, anschließend wurden die Herzen entnommen, die linken Ventrikel wurden separiert und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Betreuung dieses Tiermodells sowie alle Organentnahmen im Alter von 12 Wochen wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Vera Regitz-Zagrosek am „Center for Cardiovascular Research“ (CCR) vorgenommen und sind Bestandteil der Dissertationen von Nadine Ehrenberg (Dr. med. vet.) und Kathleen Cantow (cand. med. vet.).

2.2.2 Proteinisolierung

Die Proteinextraktion aus dem Myokardgewebe wurde mittels Proteinextraktions-Puffer (s. Abschnitt 2.1.3) vorgenommen. Die Proben wurden homogenisiert, um dann für 20 min auf Eis zu lysieren. Danach wurden die Proben kurz gevortext und bei 14.000 rpm über 10 min zentrifugiert. Eine eventuell bestehende Fettschicht wurde abgenommen und der wässrige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dabei wurden 20µl überführt und der Rest bei -80°C gelagert.

2.2.3 Proteinmessung

Die Messung der Proteine wurde mit Hilfe des BCA-Proteinmessverfahrens vorgenommen. Sie beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung einen Komplex bilden. Dieser Komplex ist bekannt als Biuret-Reaktion. Die Cu^{2+} dieses Komplexes werden zu Cu^{1+}

reduziert, die mit Bicinchinon-Säure einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wird bei 550 nm photometrisch gemessen. Als Proteinstandard dient bovines Serumalbumin. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

Die Proteinmessung erfolgte auf einer 96-Loch-Platte mit Flachboden im ELISA-(„enzyme linked immunosorbent assay“-)Platten-Lesegerät. Pro Ansatz wurden insgesamt 20 µl Probe plus 300 µl Farbstoffgemisch eingesetzt. Das Farbstoffgemisch bestand aus einem Verhältnis der BCA Protein Assay Reagenzien A zu B wie 50:1. Der Lysispuffer wurde als Negativkontrolle verwendet. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard in verschiedenen Konzentrationen pipettiert.

Die Platte wurde zugedeckt für 30 min bei 37°C im Hybridisierungssofen gelagert. Anschließend erfolgte die Proteinmessung im ELISA-Platten-Lesegerät bei 550 nm.

2.2.4 Antikörperoptimierung für das Western Blot-Verfahren

Um möglichst optimale Ergebnisse bei den Western Blot Banden zu erhalten, wurde für jedes zu detektierende Protein eine Eichgerade mit der jeweils vermuteten Antikörperkonzentration hybridisiert (s. Abschnitt 2.2.5), um die bereits vorliegenden Optimierungen zu bestätigen. Da für das Protein PGC-1 α bisher noch keine optimalen Hybridisierungsbedingungen vorlagen, wurde eine Optimierung des Antikörpers in den Verdünnungen 1/200; 1/400; 1/800 durchgeführt. Mit der Verdünnung 1/400 wurden die deutlichsten Ergebnisse in der gesuchten Proteingröße detektiert (s. Tabelle 6). Als Referenzprotein für die Proteine aus dem Western Blot-Verfahren wurde GAPDH herangezogen und auf jedem neuen Blot ebenfalls detektiert.

2.2.5 Proteinbestimmung/Western Blot

Für den Nachweis der Proteinexpression wurde die Western Blot-Methode verwendet. Hierbei handelt es sich um eine immunologische Methode zur Detektion von Proteinen, die sich in folgende Abschnitte unterteilt:

1. SDS-Gelelektrophorese
2. Proteintransfer
3. Antikörperbindung
4. Detektion

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Gele setzen sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammen (s. Tabelle 5). Für die Herstellung der Gele wurde ein Polyacrylamidgel zwischen zwei Glasplatten gegossen, dessen Zusammensetzung danach variierte, je nachdem in welcher Größenordnung sich das gesuchte Protein befand.

Reagenzien	Zusammensetzung des Trenngels (für 10%) für 15ml	Zusammensetzung des Sammelgels (für 5%) für 6ml
H ₂ O (Millipore)	5,9ml	4,1ml
30% Acrylamidmix	5,0ml	1,0ml
1.5 M Tris (pH8.8)	3,8ml	-
1.0M Tris (pH6.8)	-	0,750ml
10% SDS	0,15ml	0,060ml
10% Ammoniumpersulfat	0,15ml	0,060ml
TEMED	0,006ml	0,006ml
Pyronin Y (Farbstoff)	-	0,012ml

Tabelle 5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen für das Western Blot-Verfahren.

Die Reagenzien APS und TEMED wurden zuletzt dazu pipettiert, da diese für die Polymerisation verantwortlich sind.

Das noch flüssige Trenngel wurde luftblasenfrei zwischen zwei Glasscheiben gegossen. Anschließend wurde das Gel mittels einer Spritze mit einer Schicht H₂O (Millipore) oder wahlweise mit Isopropanol bedeckt, um es während der Polymerisation vor dem Austrocknen zu schützen. Im Anschluss an die Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und sofort mit einem Kamm versehen. Durch diesen entstanden die Taschen für die Proteine. Vor dem Auftragen wurden die Proben verdünnt und im Verhältnis 1:5 mit Gelladepuffer (s. Abschnitt 2.1.3.) versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

Nach dem Abkühlen wurden die Proben nach einem vorher festgelegten Pipettierschema in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die eingesetzten Proteinmengen betragen 12,5 µg pro Probe. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Proteingrößenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese zur Proteinauftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V, Stromstärke 350 - 400 mA und einer Leistung 400W für 1h bei 4°C in 1x Elektrophoresepuffer. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in frischem 1x

Transferpuffer gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde gleichzeitig kurz in H₂O aktiviert und die letzten 10 min vor dem Blotten in 1x Transferpuffer äquilibriert. Durch den **Proteintransfer** wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte im „Tank-Blot-Verfahren“ als luftblasenfreies „Gel-Membran-Blot-Sandwich“ unter der Verwendung von 1x Transferpuffer. Skizze des „Gel-Membran-Blot-Sandwich“:

Anodenseite



Kathodenseite

Der Proteintransfer erfolgte bei 4°C, 100V, 350mA, 400W und für 2h. Nach dem Transfer wurden die Membranen mit dem Farbstoff „Ponceau S“ rot angefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Dazu wurde die Membran 1 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend zweimal in Wasser gewaschen. Die Membranen wurden auf Filterpapier getrocknet und bis zur Antikörperhybridisierung im Kühlschrank gelagert.

Antikörperbindung-Hybridisierung

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren, wurden die Membranen für eine Stunde in 5% Blocking-Reagenz bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln inkubiert und nach diesem Vorgang 3x10 min in TBS-T gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem ausgewählten Primärantikörper für eine Stunde in der entsprechenden Verdünnung.

Antikörper /Firma	Verdünnungen
Anti PPARα Santa Cruz(H-136) sc-8312	1:200 in 3% BRG (Milchpulver)
Anti PPAR β,δ Santa Cruz(I-74) sc-7197	1:200 in 3% BSA
Anti PPARγ Santa Cruz (H-100) sc-7197	1:200 in 3% BRG (Milchpulver)
Anti PGC-1α Santa Cruz (H-300) sc-13067	1:400 in TBS-T
Anti AKT1/2/3 Santa Cruz(H-136) sc-8312	1:500 in TBS-T

Antikörper /Firma	Verdünnungen
Anti pAKT1/2/3 Santa Cruz(Ser-473)-R sc-7985-R	1:500 in TBS-T
Anti GAPDH	1:50 000 in TBS-T

Tabelle 6: Antikörper-Verdünnungen für den Einsatz auf Nitrozellulosemembranen.

Bei einem erneuten Waschvorgang (3 x 10 min in TBS-T) folgte die Inkubation mit dem spezies-spezifischen zweiten Antikörper (s. Tabelle 7) in der jeweiligen Verdünnung für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Antikörper/Firma	Verdünnung
D.a.Rabbit Dianova	1:10 000 in TBS-T
D.a.Rabbit Dianova	1:15 000 in TBS-T

Tabelle 7: 2.Antikörper-Verdünnungen für den Einsatz auf Nitrozellulosemembranen

„Stripping“-Protokoll

Zur erneuten Antikörperhybridisierung der Nitrozellulose-Membran wurde diese mit Hilfe eines „Stripping“-Puffers von bereits gebundenen Antikörpern gereinigt.

Das Strippen der Membran erfolgte im Glycin-„Stripping“-Puffer (s. Abschnitt 2.1.3) für 30 min bei 50°C unter leichtem Schütteln. Darauf folgten zwei Waschstritte von je 30 min in TBS-T Puffer bei Raumtemperatur.

Detektion

Zur Detektion des Immunkomplexes aus Primär- und Sekundäntikörper wurde ein Detektions-Reagenz für 3 min auf die Membranen gegeben. Die Membranen wurden dabei möglichst vor Lichteinflüssen geschützt. Durch die katalytische Umsetzung der an den Sekundäntikörper gebundenen Peroxidase wurde eine Chemilumineszenz erzeugt. Anschließend wurden die Membranen nach dem Abtropfen in der Dunkelkammer zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gelegt. Die entsprechenden Filme wurden dann je nach zu detektierendem Protein ca. 30 sec bis 30 Minuten belichtet und anschließend entwickelt.

2.2.6 RNA-Isolierung

Zur Gewinnung der RNA aus den linken Ventrikeln wurden ca. 30 µg tiefgefrorener Gewebestücke in ein Lysis Matrix D Gefäß gegeben, mit 600 µl RNazol versetzt und im Fast Prep-Gerät auf Stufe 4.0 für 20 sec homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit weiteren 400 µl RNazol auf 1ml aufgefüllt und für 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 30 min bei 4°C kräftig geschüttelt. Das Lysat (1ml) wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Es folgten 2 min Vortexen und eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min. Nach der Inkubation folgten 10 min Zentrifugation bei 4°C und 14000 U/min. Um die RNA zu fällen, wurde die wässrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt (ca.500 µl). Nach kurzem Vortexen wurden die Proben über Nacht bei -20°C gefällt. Die Proben wurden erneut bei 4°C für 30 min mit 14000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und das RNA-Pellet zweimal mit 1000 µl 80 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend nochmals dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Je nach Größe wurde das Pellet in 25-50 µl H₂O-DEPC aufgenommen und bei -80°C eingefroren

2.2.7 Überprüfung der RNA-Qualität

Die Integrität der isolierten RNA wurde mit einem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) überprüft. Das Messprinzip dieser Methode beruht auf einer elektrophoretischen Auftrennung nach Größe der RNA in einer Kapillare („lab on a chip“) mittels photometrischer Detektion. Zur Beurteilung der RNA- Qualität diente das Verhältnis 28S/18S der rRNA-Banden und die so genannte RNA-Integritäts-Nummer (RIN), sie sollte optimalerweise bei 10.0 liegen. In der RIN wurden neben dem Verhältnis 28S/18S der rRNA-Banden auch noch weitere Qualitätsmerkmale wie Anomalien in der 5S Region oder Anomalien in der Basislinie zusammengefasst (s. Abbildung 1).

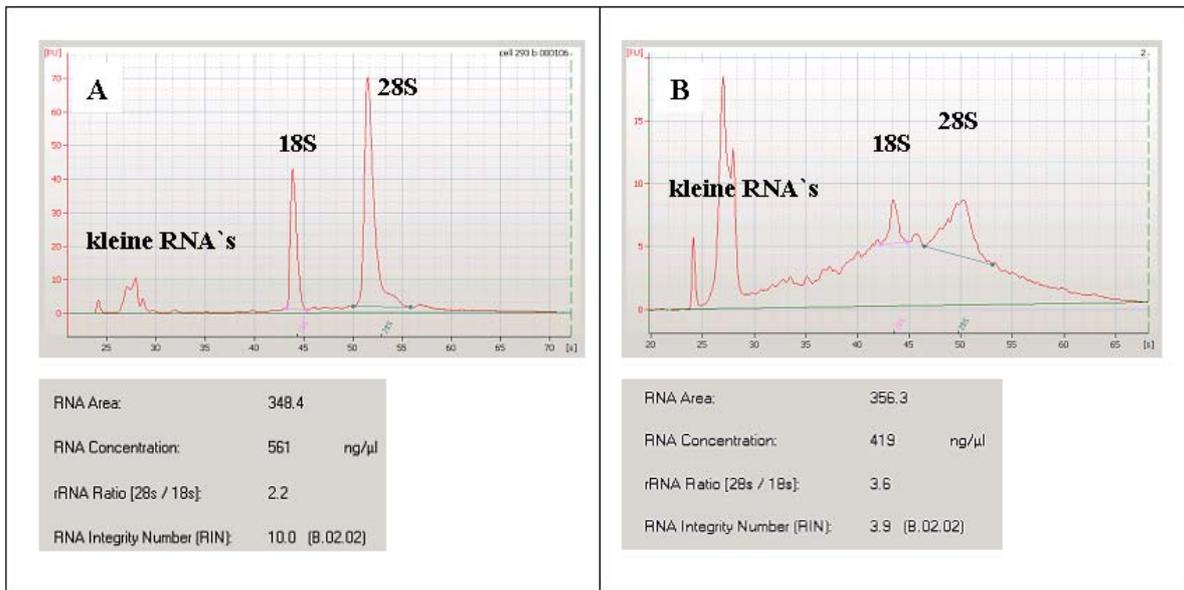


Abbildung 1: Darstellung zweier unterschiedlicher RNA-Populationen im Bioanalyser. Die RNA-Qualität wird durch das 28S/18S rRNA-Verhältnis charakterisiert, welches idealerweise bei ~2.0 liegt, und einer "RNA Integrity Number" (RIN), welche idealerweise bei 10.0 liegt (A). Beginnende Degradation der RNA führt zu einer Abnahme des 28S/18S Ratios bzw. nicht mehr sinnvollen Werten und kleineren RIN (B).

2.2.8 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um die exakte RNA-Konzentration pro Probe zu ermitteln, wurden alle Messungen mit dem RNA 6000 Nano Reagents & Supplies Kit (Agilent Technologies) und dem RNA 6000 Ladder (Ambion 7152) als Größen- und Konzentrationsstandard durchgeführt (s. Tabelle 8). Dazu wurden pro Probe 10μl isolierte RNA eingesetzt.

Reagenz	Firma
RNase ZAP	Ambion
RNA 6000 Ladder	Ambion
RNA Nano Dye Konzentrat	Ambion
RNA 6000 Nano Marker	Ambion
RNA 6000 Nano Gel Matrix	Ambion

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Reagenzien für die RNA-Konzentrationsmessung (Agilent 2100 Bioanalyser).

Das RNA 6000 Nano Dye Konzentrat wurde 30min bei Raumtemperatur equilibriert und der RNA- Ladder 2 min bei 70 °C denaturiert, um anschließend auf Eis gelagert zu werden.

Darauf wurden 65 μl Nano Gel Matrix zusammen mit 1 μl RNA Nano Dye Konzentrat in ein Eppendorfgefäß gegeben. Das RNA-Konzentrat wurde zuvor gevortext und 10 sec bei 13000 U/min zentrifugiert. Nun wurden je 9 μl Gel-Farbstoff-Mixtur in drei mit dem Buchstaben G gekennzeichnete Wells pipettiert, sowie 5 μl RNA 6000 Nano Marker in jedes der Probewells einschließlich des Ladder-Wells pipettiert. In das speziell gekennzeichnete Ladder-Well wurde zusätzlich 1 μl der RNA 600 Ladder Reagenz gegeben. Nun wurde je 1 μl der zu bestimmenden Proben in die Proben-Wells pipettiert. Der beladene Chip (s. Abbildung 2) wurde darauf bei 24000 rpm gevortext. Im Anschluss konnte die Messung im Bioanalyser erfolgen.

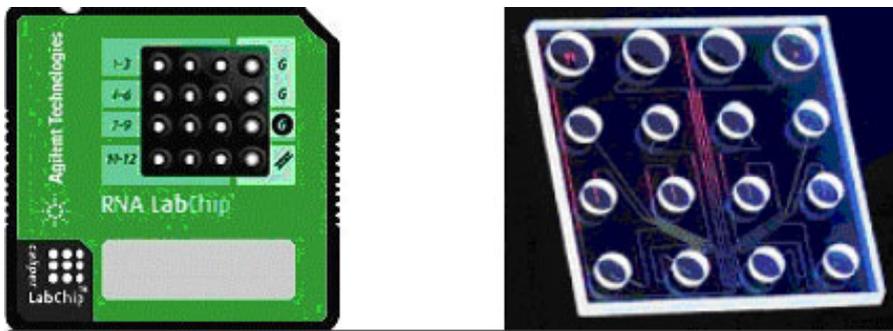


Abbildung 2: Bild vom Chip/www.cfgbiotech.com (Agilent 2100 Bioanalyser) [53].

2.2.9 Charakterisierung der isolierten RNA-Proben mittels Bioanalyser

Alle RNA-Proben wurden auf ihre Konzentration, Reinheit und Integrität mittels des Bioanalyzers Agilent- 2100 untersucht. Abbildung 3 zeigt exemplarisch eine Übersicht der Proben 23-34 mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen einschließlich des Ladders. Alle Proben waren bei dieser Qualitätsuntersuchung rein und zeigten weder Lösungsmittel- noch Proteinverunreinigungen. Abbildung 4 zeigt exemplarisch an Probe Nummer 33 Konzentrationsangaben, rRNA Ratio (18s und 28s) und die Integrity Number (RIN).

Die Abbildung 5 zeigt entsprechend der RIN Werte aus Abbildung 3 eine gelähnliche Agilent- Ergebnis-Darstellung.

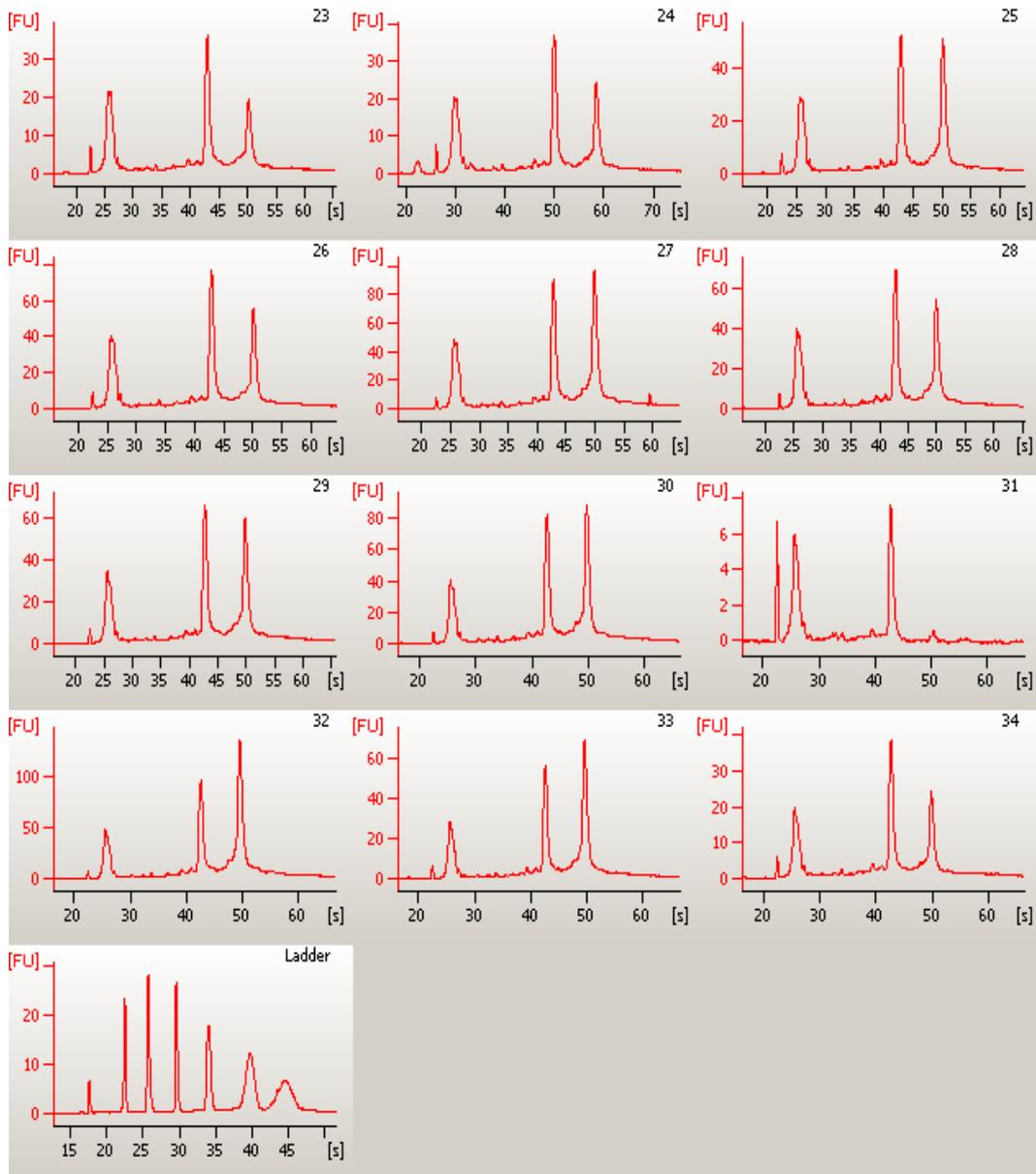


Abbildung 3: Grafische Darstellung einer Chipauswertung exemplarisch mit den Proben 23-34 einschließlich „Ladder“.

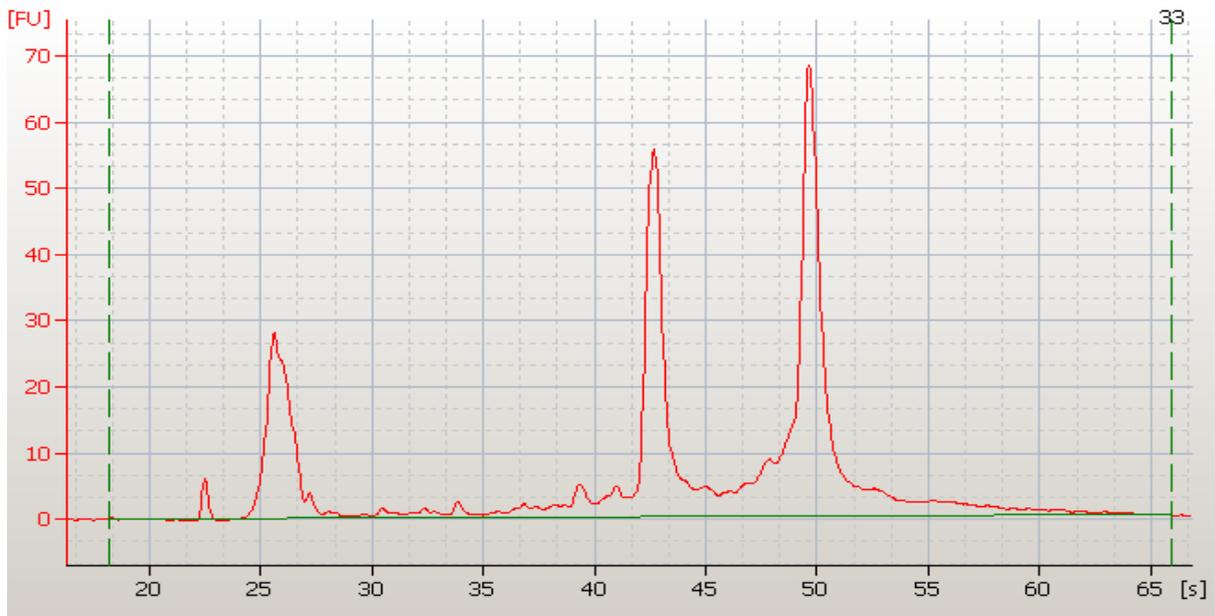


Abbildung 4: Exemplarisch: Probe Nr.33 mit Konzentrationsangaben RNA Area 554,9; RNA Konzentration 377 ng/ μ l;rRNA Ratio (28s/18s) 1,3;RNA Integrity Number (RIN) 9,2 (B 0,2.0.3). Erster Anstieg pre-Region; zweiter Anstieg Marker, fast-region; dritter Anstieg 18 s-fragment, inter-region; vierter Anstieg 28 s-fragment, precursor und post-region.

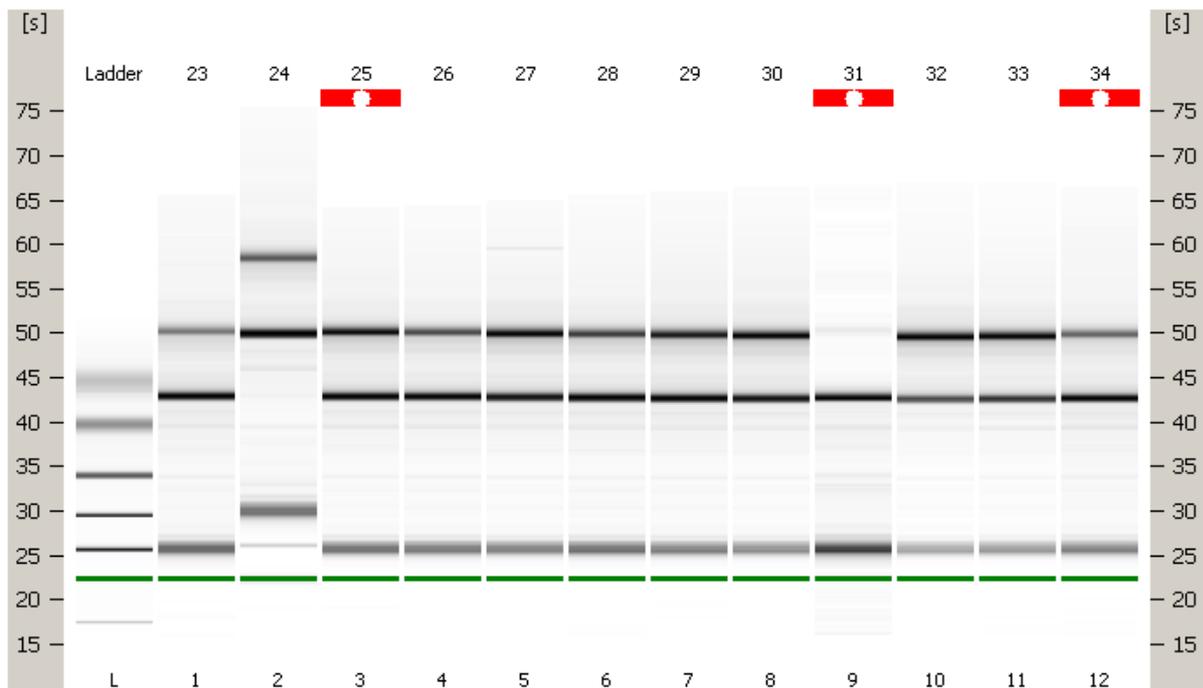


Abbildung 5: Gelabbildungen. Exemplarisch: Proben 23-33 aus dem Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.2.10 Reverse Transkription

Mittels der reversen Transkription wurden die RNA-Proben in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um anschließend die Genexpression mit Hilfe der Real-Time-PCR

analysieren zu können. Die cDNA-Synthese erfolgte durch das Enzym SuperscriptII-Reverse Transkriptase, welches u.a. die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aufweist. Eventuell vorhandene RNasen wurden durch Zusatz des RNase-Inhibitors „*RNAse-Out*“ inaktiviert. Im Ansatz wurden die RNA-Proben auf 125 ng/μl verdünnt. Jeweils 600 μg (= 4 μl) aus diesem Ansatz wurden mit DEPC Wasser auf 10 μl aufgefüllt und anschließend mit 2μl Random-Primer versetzt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 70°C für 10 min inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen, und bis zur Zugabe des Mastermixes auf Eis gekühlt.

Der Mastermix enthielt:

- 4,0 μl Puffer (5-fach konzentriert)
- 1,0 μl dNTP (0,5mM)
- 1,0 μl RNase-Inhibitor (2U/μl)
- 2,0 μl DTT (10mM)
- 1,0 μl Superscript-II

Der Ansatz wurde mit 9 μl des Mastermix gemischt, kurz zentrifugiert, zuerst 10 min bei RT, dann für 50 min bei 42°C inkubiert. Zum Stoppen der cDNA-Synthese wurde das Enzym 5 min bei 95°C im Thermoblock inaktiviert und der Mix kurz auf Eis abgekühlt.

Für die sich anschließende Real-Time-PCR wurden die Proben mit je 4 μl DEPC Wasser auf 5 ng/μl verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.11 Optimierung und Auswahl der Primer für die „real-Time PCR“

Vor der Verwendung der genspezifischen Primer wurden mit jedem Primerpaar Amplifikationen einer Eichgeraden aus einem Probenpool der unterschiedlichen Myokardproben aus den vier Gruppen vorgenommen, um die vermutete Annealing-Temperatur, Zykluszahl und das Primerverhältnis zu ermitteln.

Für die Gene PPARβ/δ und COX5A wurde zusätzlich das spezifische Primerverhältnis von FW und RV Primer getestet, 1:1 FV/RW; 1:3 FV/RW oder 3:1 FV/RW (für die verschiedenen Bedingungen s. Abschnitt 2.1.5.).

Das Primerdesign wurde mit Hilfe der Primer-Software (www.roche.com) vorgenommen. Nach Möglichkeit wurden die Primer so gewählt, dass sie intronüberspannend waren, um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen.

2.2.12 Real-Time-PCR

Die real-time-quantitative PCR (rt-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Sie beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), bietet aber zusätzlich durch Fluoreszenz-Messungen die Möglichkeit der Quantifizierung. Ihr Vorteil zu herkömmlichen Methoden liegt darin, dass die Daten während des PCR-Prozesses kontinuierlich gewonnen werden. Ein Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in der DNA an, wodurch die Intensität proportional mit der Menge des PCR-Produktes zunimmt. Das ermöglicht die Quantifizierung. Eine gelelektrophoretische Auftrennung ist nicht nötig. Des Weiteren sind die Daten sofort verfügbar. Gemessen wird die Zunahme der Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge nach jedem Amplifikationszyklus. Für die Quantifizierung kann mit spezifischen Fluoreszenz-markierten-Sonden oder mit einfachen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR-Green gearbeitet werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green verwendet. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um einen hochspezifischen Marker für doppelsträngige DNA, der somit jede Form von doppelsträngiger DNA detektieren kann. Eine gut optimierte PCR-Reaktion ist deswegen eine Voraussetzung für genaue Ergebnisse. Andernfalls kann es durch unspezifische Bindungen zu falsch positiven Ergebnissen kommen.

Die rt-PCR-Reaktion kann in drei aufeinander folgende Phasen unterteilt werden: Die ersten Zyklen der rt-PCR-Reaktion führen zu keiner nennenswerten Änderung des Fluoreszenz-Signals und stellen somit die „Baseline“ dar. Nachdem ein Schwellenwert an Zyklen überschritten ist, durchläuft die PCR-Reaktion die erste sog. exponentielle Phase, in der eine exakte Verdopplung des DNA-Produkts hochspezifisch mit einer ungefähr 100%igen Effizienz stattfindet. In dieser Phase wird der Ct-Wert („cycle threshold“) bestimmt.

In der sich anschließenden zweiten sog. linearen Phase, in der ein Großteil der Reaktionskomponenten bereits verbraucht ist, verlangsamt sich die Reaktion und erste Produkte degradieren. Zum Ende der Reaktion stellt sich die dritte Phase, die sog. Plateauphase ein. Hier kommt die Reaktion zum Stoppen, keine weiteren Kopien werden hergestellt und die PCR-Produkte degradieren. Der beste Zeitpunkt zur Auswertung der rt-PCR ergibt sich deshalb innerhalb der exponentiellen Phase.

Durchführung der RT-PCR

Zur Herstellung eines Proben-Pools wurden 5 μl aus jeder Probe entnommen (Probenpool 295 μl , 20 ng/ μl). Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe aus dem Proben-Pool im Verhältnis 1:4 hergestellt.

Master Mix (1:1)	
FW -Primer	1 μl (konzentriert)
RV - Primer	1 μl (konzentriert)
SYBR-Green	12,5 μl (konzentriert)
H2O	5,5 μl (konzentriert)

Tabelle 9: Zusammensetzung Master Mix für die Real-Time mit dem Primerverhältnis 1:1; Ansatz für ein Well in 96er Platte.

Für den Primermix wurden die genspezifischen Forward- und Reverse-Primer von einer Ausgangskonzentration von 50 pmol auf eine Endkonzentration von 5 pmol pro Probe mit Aqua dest. verdünnt (s. Abschnitt 2.1.5.). Die Ansätze wurden kurz zentrifugiert und dann in eine 96-Well Platte aufgetragen. Im Anschluß wurde die PCR-Reaktion im ABI-7000 gestartet. Alle Proben wurden im Doppelansatz pipettiert, ebenso wie die Negativkontrolle.

Auswertung der RT-PCR

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mittels der ABI 7000-Software, im Detail mit der Funktion Auto-Ct und Auto-Baseline. Diese Funktionen stellen automatisch ermittelte Werte dar. Dabei stellt die Auto-Baseline den Wert dar, bei dem die Produktmenge erstmalig gemessen wird. Der Auto-Ct-Wert ist die Stelle, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt. Durch den Abgleich der ermittelten eigentlichen Ct-Werte mit dem ermittelten Standard-Ct-Wert des Computers erstellt das Programm die Menge an DNA des jeweiligen Zielgens. Auch eine manuelle Einstellung dieser Funktionen ist möglich. Bei dieser Arbeit wurde mit dem Vergleich der Autofunktion gearbeitet. Die Mittelwerte eines jeden Doppelansatzes wurden mit Hilfe des Excel-Office-Software-Programms auf die entsprechenden Mittelwerte des Referenzgens HPRT, was für alle gemessenen Gene herangezogen wurde, bezogen und ausgewertet.

2.2.13 Statistische Auswertung

Statistische Analysen der Gen- und Proteinexpressionen wurden mittels des Statistik-Programms SPSS für Windows 15 durchgeführt. Getestet wurde mittels der Varianzanalyse

Anova (=Analysis of variance). Dies ist ein Hypothesen testendes Verfahren, das untersucht, ob sich die Mittelwerte zweier oder mehrere Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Anschließend wurde der Tukey-Test angewandt. Dieser Test prüft, ob es beim paarweisen Vergleich zwischen mehreren Mittelwerten Unterschiede gibt. Innerhalb der Gruppen wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test getestet.

Ein p-Wert von $<0,05$ wurde bei der Auswertung als statistisch signifikant bewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler ($MW \pm SEM$). Die Gruppengröße betrug $n=15$, variierte aber bei der männlichen „Running-Gruppe“ mit $n=14$, da ein Tier während des Laufradtrainings verstarb.

3 Ergebnisse

3.1 Laufradtraining induziert Myokardhypertrophie

Um den Kontext der Analysen noch einmal zu zeigen, wird an dieser Stelle kurz auf das wichtigste physiologische Ergebnis des Tierexperiments eingegangen. Das Tierexperiment ist Gegenstand der Doktorarbeiten von Nadine Ehrenberg (Dr.med.vet.) und Kathleen Cantow (Cand.med.vet) (TV 0148/06/ Prof. Dr. med.Vera Regitz-Zagrosek). Männliche und weibliche Tiere entwickelten nach 5 Wochen freiwilligem Laufradtraining eine milde aber signifikante Hypertrophie. Dabei war die Hypertrophie in den weiblichen Tieren stärker ausgeprägt als in den männlichen Tieren (s. Abbildung 6).

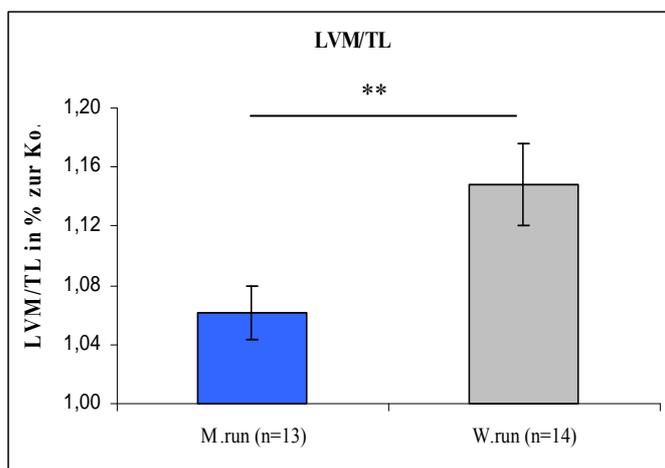


Abbildung 6: Darstellung des Verhältnisses der Masse des linken Ventrikels (LVM)/ Tibialänge (TL) der „Running-Gruppe“ in Bezug auf die gleichgeschlechtliche Kontrollgruppe (Ko.). Kontrollgruppe=100%; **p<0,01.

3.2 Proteinexpression

3.2.1 Proteinexpression PPARs, Kofaktor PGC-1 α und Akt

Um zu untersuchen, ob es nach Ausdauerbelastung zu einer erhöhten Expression spezifischer Proteine des Fettstoffwechsels kommt, wurden die Proben mittels des Western Blot-Verfahrens (s. Abschnitt 2.2.5.) analysiert. Insgesamt konnten für die Proteine PPAR β/δ ; PGC-1 α ; Akt und P-Akt/Akt veränderte Expressionen festgestellt werden (s. die Abbildung 8, 10,11,12). Zu keiner signifikanten Unterscheidung zwischen den Gruppen und den Geschlechtern kam es bei den Proteinen PPAR α und PPAR γ (s. Abbildung 7 und 9).

Bei der Expression von PPAR α (s. Abbildung 7) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Kontroll- und der Ausdauergruppe festgestellt werden. Es gibt keinen Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren.

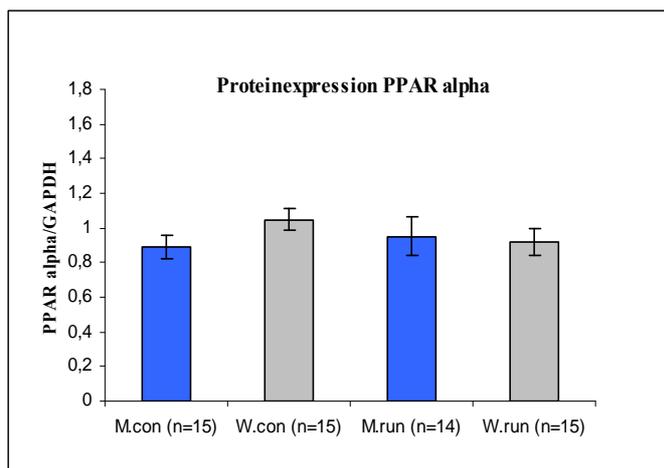


Abbildung 7: Proteinexpression PPAR α

Für die Expression des Proteins von PPAR β/δ ergab sich eine signifikant geringere Proteinexpression bei den weiblichen Tieren nach Ausdauerbelastung verglichen mit der Kontrollgruppe der weiblichen Tiere (s. Abbildung 8). Zwischen der männlichen Kontroll- und der Ausdauergruppe gab es keine signifikanten Unterschiede, aber gleiche Tendenzen.

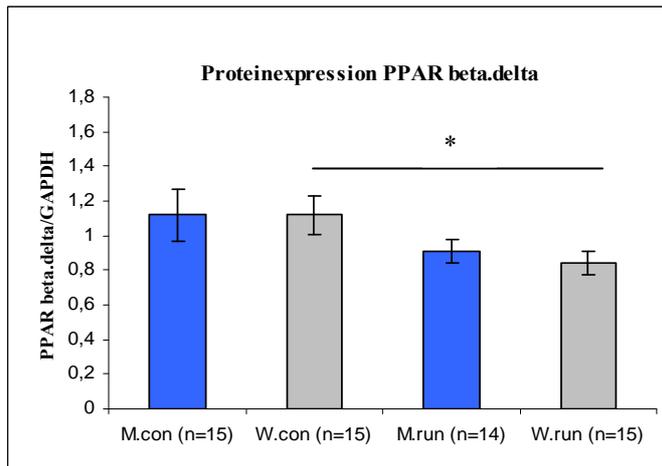


Abbildung 8: Proteinexpression PPAR β/δ ;

Bei der Expression von PPAR γ (s. Abbildung 9) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Kontroll- und der Ausdauergruppe festgestellt werden. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern gezeigt werden.

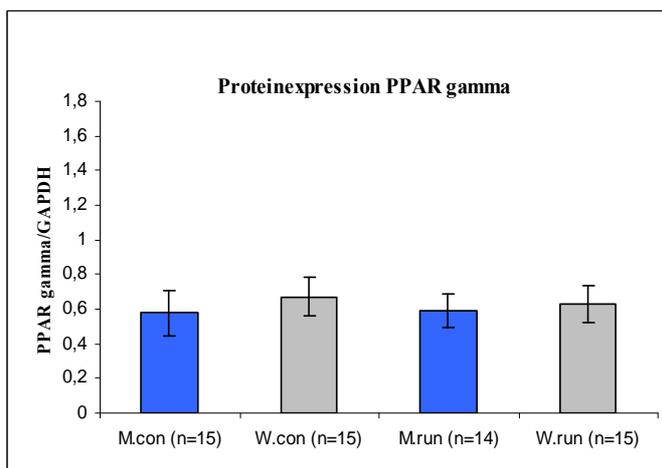


Abbildung 9: Proteinexpression PPAR γ

Die Proteinexpression von PGC-1 α zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den männlichen und den weiblichen Kontrolltieren. Es lag eine höhere Expression des Proteins PGC-1 α bei den weiblichen Kontrolltieren vor. Die Proteinexpression von PGC-1 α verringerte sich in beiden Geschlechtern nach freiwilligem Laufradtraining, ohne statistische Signifikanz zu erreichen (s. Abbildung 10).

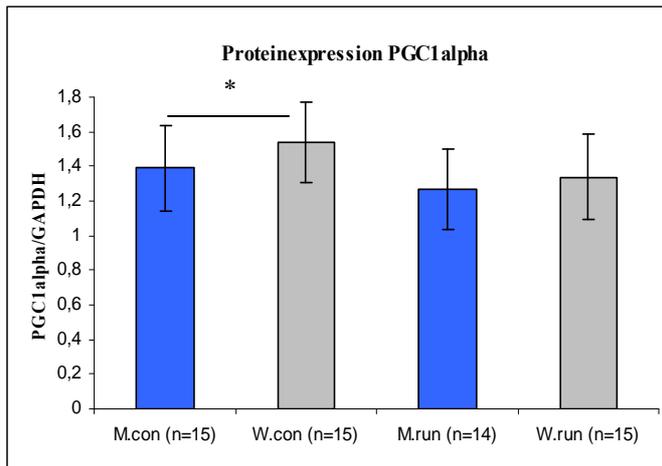


Abbildung 10: Proteinexpression PGC-1 α

Die Expression des Proteins von Akt zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den männlichen und den weiblichen Kontrolltieren. Es lag eine höhere Expression des Proteins Akt bei den weiblichen Tieren der Kontrollgruppe vor. Keine signifikante Änderung der Expression ließ sich bei weiblichen und männlichen Tieren nach Ausdauerbelastung feststellen (s. Abbildung 11).

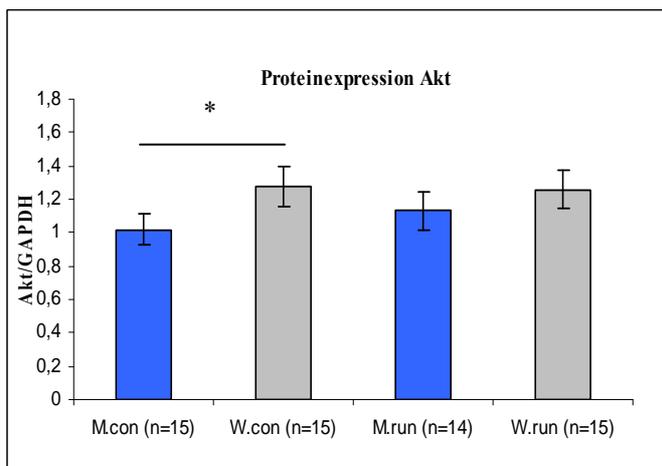


Abbildung 11: Proteinexpression Akt

Bei der Auswertung des Quotienten P-Akt/Akt ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Kontrolltieren. Dabei fiel in der Auswertung die höhere Expression bei den männlichen Kontrolltieren auf. Bei P-Akt handelt es sich um die phosphorylierte und damit aktive Form der Kinase (s. Abbildung 12).

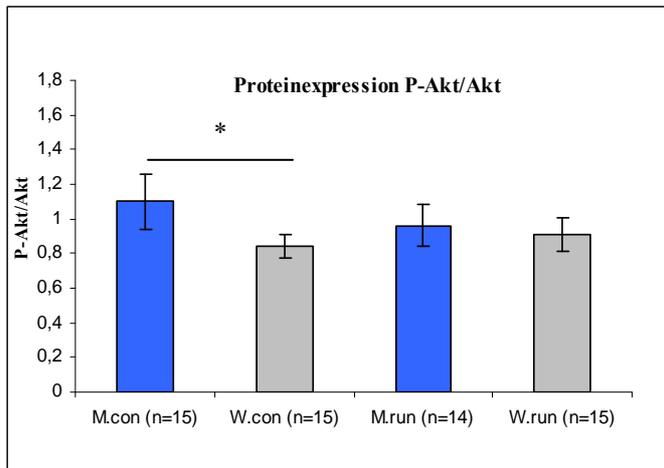


Abbildung 12: Proteinexpression P-Akt/Akt

3.3 Genexpression

3.3.1 Keine signifikanten Veränderungen bei Genexpression in Fett- und Glukosestoffwechselgenen

Um eine veränderte Expression spezifischer Gene innerhalb des kardialen Stoffwechsels zu ermitteln, wurden alle analysierten Gene mittels der rt-PCR untersucht. Als Regulatoren des Fettstoffwechsels wurden PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ und PGC-1 α untersucht, als direkte Zielgene des Fettstoffwechsels die Gene LPL, CD36, CPT1, MCAD, COX5A und für den Glukosestoffwechsel die Glukosetransporter Glut1 und Glut4. Durch die Messung sollte ein Eindruck von der Stoffwechsellage der hypertrophen Herzen der Tiere insbesondere in Bezug auf den Fettstoffwechsel gewonnen werden. Als Referenzgen („housekeeping“ Gen) wurde HPRT herangezogen, da es nicht reguliert wird und damit als konstanter Bezugspunkt für die Beurteilung der Zielgene gelten kann. Dargestellt sind die jeweiligen Gene in Diagrammen mit Mittelwerten und dem Standardfehler des Mittelwertes („*standard error of the mean*“).

3.3.2 Unveränderte Genexpression der PPARs und des Kofaktors PGC-1 α

Bei der Gruppe der PPARs (α , β/δ und γ) wurden keine Veränderungen in der Genexpression nach dem 5-wöchigen freiwilligen Laufradtraining beobachtet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren festgestellt werden. Die Genexpression des Kofaktors PGC-1 α blieb nach Ausdauertraining ebenfalls unverändert. Geschlechterunterschiede traten weder auf Basalniveau noch nach Induktion der physiologischen Hypertrophie auf (s. Abbildung 13a-d).

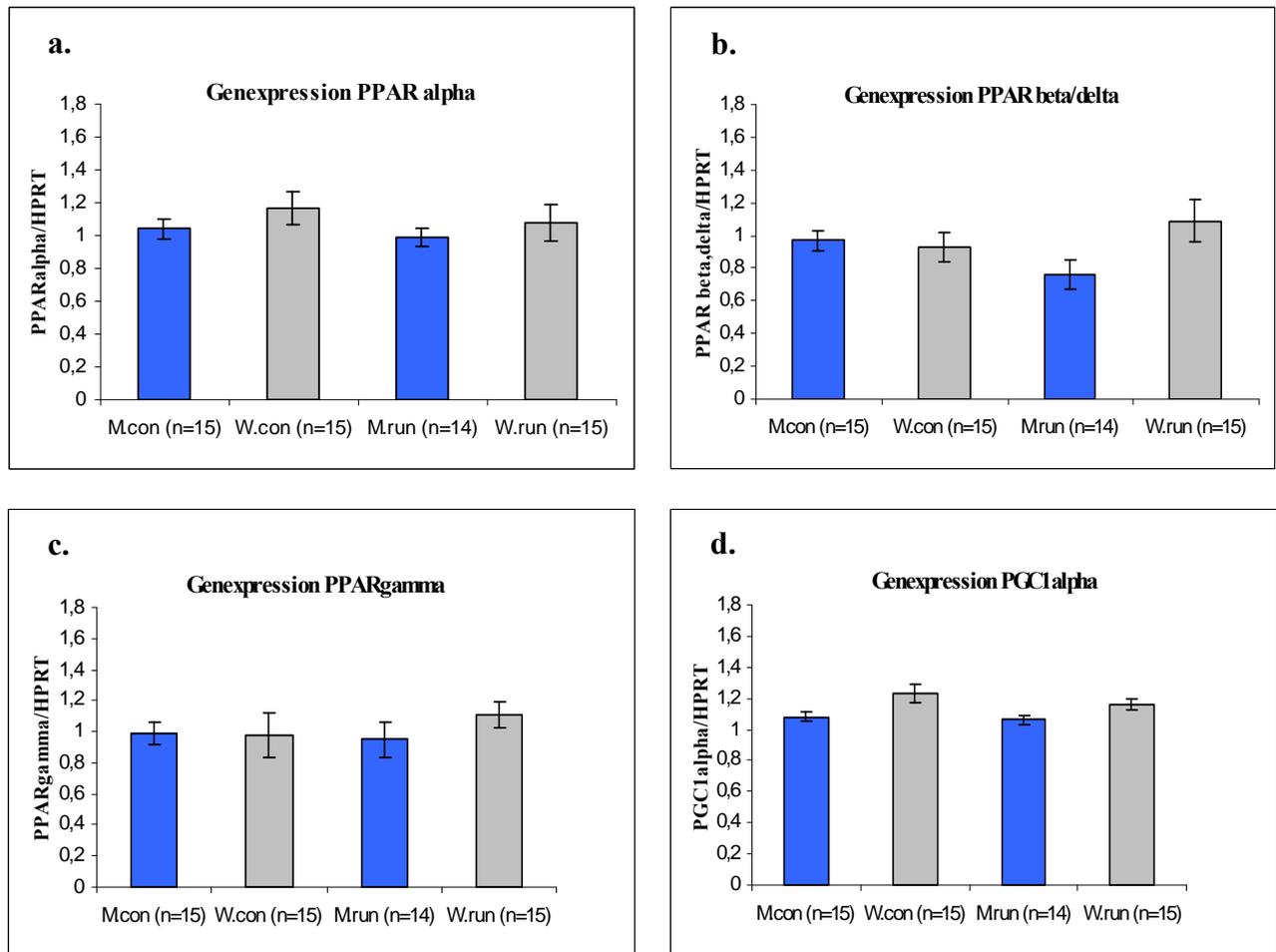


Abbildung 13a-d: Dargestellt sind die untersuchten PPARs (α ; β / δ ; γ) sowie der PPAR-Kofaktor PGC-1 α . Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte.

3.3.3 Expression der Zielgene

Als direkte Gene des Fettstoffwechsels wurden die Expressionen der Gene (LPL, CD36, CPT1, MCAD und COX5A) im Myokardgewebe der Tiere vor und nach Ausdauerbelastung ausgewertet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Ausdauergruppe ebenso wie zwischen den Geschlechtern festgestellt werden (s. Abbildung 14a-e).

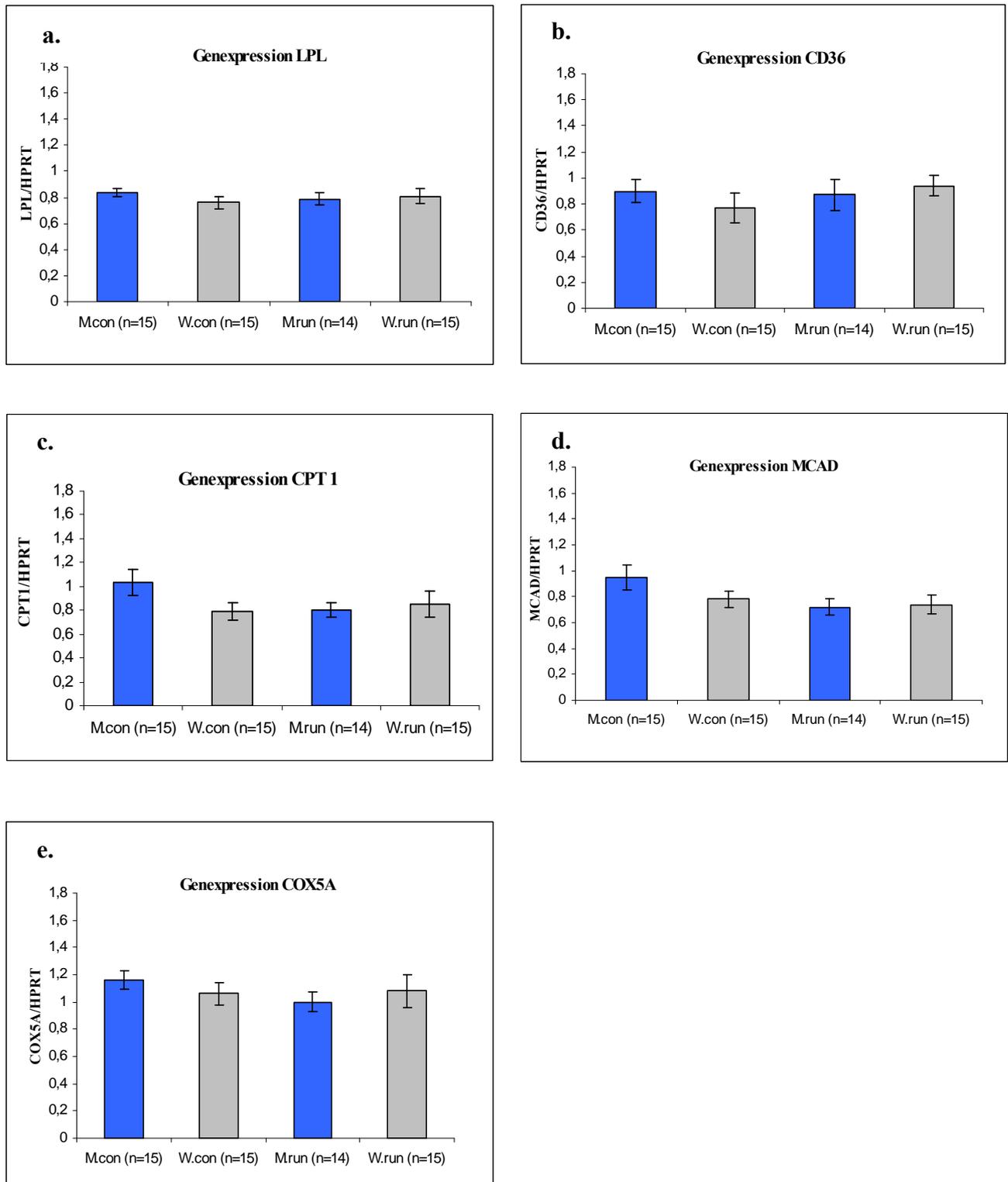


Abbildung 14a-e:Dargestellt sind die untersuchten Gene des Fettstoffwechsels (LPL; CD36; CPT1; MCAD; COX5A). Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte und den Standardfehler des Mittelwertes.

3.3.4 Genexpression der Glukosetransporter

Die Auswertung möglicher Regulation der Gene des Glukosestoffwechsels (Glut1 und Glut4) ergab keine signifikanten Unterschiede der Expression der Gene zwischen den Tieren der Kontroll- und der Ausdauergruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression bei männlichen und weiblichen Tieren festgestellt werden (s. Abbildung 15a-b).

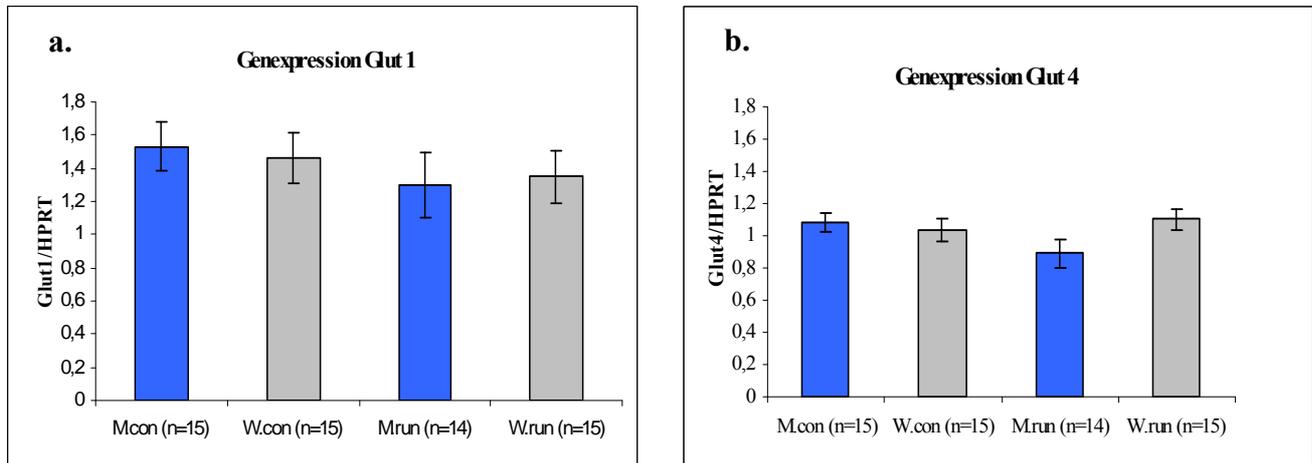


Abbildung 15a-b: Dargestellt sind die Genexpressionen der Glukosetransporter (Glut1 und Glut4); jeweils mit Mittelwerten und dem Standardfehler des Mittelwertes.

4 Diskussion

4.1 *Belastungsinduzierte und geschlechtsspezifische Veränderungen bei Laufradtraining*

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Diskussion von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Gen- und Proteinexpression des myokardialen Stoffwechsels im Zuge einer physiologischen linksventrikulären Hypertrophie. Diese Arbeit beruht auf einem Tiermodell der physiologischen Hypertrophieentwicklung. Es wurde dabei gezeigt, dass die weiblichen Tiere im Vergleich zu den männlichen Tieren mehr kardiale Hypertrophie bei einem freiwilligen Ausdauertraining entwickelten (s. 3.1. Abbildung 6). Innerhalb der untersuchten Protein- und Genexpressionen konnten Geschlechterunterschiede bei einigen der untersuchten Proteine (PPAR β/δ , PGC-1 α und Akt) festgestellt werden.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass weibliche Tiere eine erhöhte Ausdauerkapazität mit einer deutlich stärkeren Zunahme der kardialen Masse zeigen und die bestehenden geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht an der Art der Ausdauerleistung festzumachen sind [50]. Tests an C57BL/6J Mäusen, die unter Stressbedingungen ein Laufradtraining absolvieren mussten, zeigten, dass weibliche Tiere eine höhere maximale Geschwindigkeit während des Laufens erreichten und insgesamt eine größere Strecke an Kilometern pro Tag zurücklegten. Dies, so vermutet man, wird durch verschiedene Einflüsse von geschlechtsspezifischen Hormonen wie z.B. dem Östrogen reguliert, die verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Zahlreiche Faktoren steuern hierbei die Leistungsbereitschaft und deren Auswirkungen auf das kardiale System [50]. Diese Komplexität führt zu Ergebnissen, die auf den ersten Blick unklar erscheinen. Einerseits wurde berichtet, dass Ratten (weibliche und männliche Tiere), die schwimmend und unter Stress ein Ausdauertraining absolvierten, keine Vergrößerung des Herzgewichtes gegenüber einer Kontrollgruppe zeigten. Eine andere Studie zeigte hingegen eine signifikante Vergrößerung des HW/BW bei weiblichen Tieren im gleichen Versuchsaufbau [50]. Auch Versuche an C57BL/6J Mäusen zeigten bei gleichem Versuchsaufbau geschlechtsspezifische Unterschiede mit einer deutlichen kardialen Hypertrophie bei den weiblichen Tieren [50]. Die Ergebnisse von Konhilas et. al aus Ausdauerleistungs-Versuchen mit zwei unterschiedlichen Mäusestämmen zeigen ebenfalls, dass bei beiden Stämmen jeweils die Weibchen eine bis zu dreifach stärkere linksventrikuläre Hypertrophie entwickelten [50].

4.2 Beobachtete Veränderungen von Proteinexpressionen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen konnte eine signifikante Abnahme der Proteinexpression des Faktors PPAR β/δ bei den weiblichen Tieren nach Ausdauerbelastung im Vergleich zur Gruppe der weiblichen Kontrolltiere festgestellt werden. Ebenfalls konnte ein Trend in der Abnahme der Expression von PPAR β/δ bei den männlichen Tieren nach Ausdauerbelastung im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe beobachtet werden. Dieser war aber nicht signifikant (s. Abbildung 8). Die Ergebnisse zeigen damit einen Geschlechterunterschied. Möglicherweise zeigen sie auch eine verminderte Energiegewinnung über die Glukose, was nach einer Ausdauerleistung zu erwarten wäre.

Aus der Literatur ist von dem Transkriptionsfaktor PPAR β/δ bekannt, dass dieser eine wichtige regulatorische Funktion im Fettsäuremetabolismus in zahlreichen Geweben spielt [54]. Eine besondere Stellung nimmt der Faktor im kardialen Fettsäuremetabolismus ein [55], da die Kardiomyozyten auf die Expression dieses Faktors für die Energiegewinnung angewiesen sind. Bekannt ist auch, dass eine Inaktivierung bzw. eine verminderte Expression von PPAR β/δ eine Verminderung an Genen der β -Oxidation verursacht, ebenso wie eine myokardiale Lipidakkumulation [56]. Dies begünstigt die Entstehung von pathologischer Hypertrophie und Herzleiden [33].

Burkart et al. konnten zu diesen Ergebnissen zusätzliche Unterschiede zwischen den PPAR-Isoformen PPAR α und PPAR β/δ aufzeigen [56]. Dabei zeigte sich, dass beide Faktoren zwar in den kardialen Fettsäurestoffwechsel integriert sind, PPAR β/δ aber zusätzlich weitere Gene des Glukosestoffwechsels zu aktivieren scheint, wohingegen PPAR α die Expression entsprechender Zielgene unterdrückt [56].

Ebenfalls wurde die Genexpression der „*medium-chain-acyl-CoA-dehydrogenase*“ (MCAD) untersucht. Dabei zeigten sich weder in der Genexpression zwischen der Kontroll- und der Ausdauergruppe noch zwischen männlichen und weiblichen Tieren signifikante Unterschiede. Festzustellen war jedoch ein Trend zur Verminderung der Genexpression, sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren der Ausdauergruppe gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen (s. Abbildung 14d).

MCAD ist ein Zielgen von PPAR α und PPAR β/δ und trägt zur Aufrechterhaltung des Fettsäurestoffwechsels bei [25]. Die Ergebnisse von PPAR β/δ und seinem Zielgen MCAD sind in der verminderten, wenn auch bei MCAD nicht signifikanten Genexpression bei Ausdauer konform. Scheinbar wird PPAR β/δ und in Folge auch MCAD bei Ausdauer

vermindert exprimiert. Erwartet wurde eine verstärkte Energiegewinnung über den Fettsäurestoffwechsel nach Ausdauerbelastung.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Proteinexpression des Kofaktors PGC-1 α konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den weiblichen und männlichen Tieren der Kontrollgruppe festgestellt werden. Hier wiesen die weiblichen Tiere eine höhere PGC-1 α Proteinexpression auf als die männlichen Tiere (s. Abbildung 10).

Hierbei kann die Tatsache von Bedeutung sein, dass PGC-1 α zwar stärker als andere Kofaktoren in Geweben mit einer hohen Anzahl an Mitochondrien (z.B. myokardiales Gewebe) exprimiert wird [14], aber auch Funktionen in Bereichen einnimmt unabhängig von der Rolle als Kofaktor von PPAR α . So ist aus der Literatur bekannt, dass PGC-1 α die mitochondriale Biogenese in kardialen Myozyten stimuliert sowie mitochondriale Funktionen beeinflusst [14, 38]. Möglicherweise ist daher das vorliegende Ergebnis nicht Ausdruck eines erhöhten Energiebedarfs, sondern deutet auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der mitochondrialen Biogenese hin. Auch ist bekannt, dass die Proteinexpression von PGC-1 α über Östrogenrezeptoren reguliert wird [36]. Somit könnte die erhöhte Proteinexpression von PGC-1 α der weiblichen Kontrolltiere auch Ausdruck eines Geschlechterunterschiedes in der Ausgangssituation sein, der sich damit trotz ausbleibender Steigerung des Faktors nach Ausdauertraining zwischen männlichen und weiblichen Tieren andeuten würde.

Keine signifikanten Veränderungen der Expression von PGC-1 α zeigten sich zwischen der Gruppe der Kontrolltiere und der Gruppe der Tiere nach Ausdauerbelastung. Dies betraf sowohl die männliche, als auch die weibliche Gruppe. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Hypothese einer Steigerung der Faktoren nach Ausdauer, eine mögliche Begründung hierfür könnte der Untersuchungszeitpunkt sein (s. Abschnitt 4.4.).

Ebenfalls ergab sich ein signifikanter Unterschied bei der Untersuchung der Proteinexpression der Serin-Threoninkinase „Akt“. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression von „Akt“ in der Gruppe der weiblichen Kontrolltiere gegenüber der männlichen Kontrollgruppe. Bei den Tieren nach Ausdauertraining war kein signifikanter Anstieg der Kinase bei beiden Geschlechtern zu vermerken (s. Abbildung 11).

Die Ergebnisse der vorliegenden aktuellen Arbeit zeigen damit einen Geschlechterunterschied in der Ausgangssituation. Bereits bekannt sind Geschlechterunterschiede ohne Beeinflussung durch ein Ausdauertraining bei der Kinase „Akt“ und seiner phosphorylierten Form „p-Akt“. So zeigten Versuche mit humanem und tierischem Material, dass „p-Akt“ bei jungen

(prämenopausalen) Frauen in einem höheren Maße vorliegt als bei gleichaltrigen Männern oder postmenopausalen Frauen [50, 57]. Ebenfalls konnte ein Tiermodell zeigen, dass „Akt“ bei weiblichen Mäusen im Herzgewebe gegenüber dem Gewebe der männlichen Tiere erhöht ist [47].

Bekannt ist, dass drei Isoformen der Serin-Threoninkinase „Akt“ existieren. Alle drei Isoformen werden im Myokard exprimiert und sind über intra- und extrazelluläre Prozesse an der Entstehung einer Hypertrophie beteiligt [48]. Es scheint, dass besonders die Isoformen Akt1 als auch Akt3 an der Regulation sowohl von physiologischer als auch pathologischer Hypertrophie beteiligt sind [48]. Die Bedeutung von Akt2 bei der myokardialen Hypertrophie ist zwar weitestgehend unbekannt, es wird aber von einer geringeren Bedeutung für physiologisches und pathologisches kardiales Wachstum ausgegangen [48].

Untersuchungen zeigen, dass die „Akt-Kinase“ den Fettsäurestoffwechsel durch Phosphorylierung hemmt [48]. Von Interesse ist hierbei die Arbeit von Konhilas et al. [50]. Hier konnte in einem Ausdauerleistungsversuch an C57BL/6J Mäusen kein Anstieg von „Akt“ festgestellt werden. Hingegen zeigte sich, dass es bei der aktiven phosphorylierten Form zu einem signifikanten Anstieg bei den weiblichen und männlichen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe kam [50]. Bei einem gesteigerten Fettsäurestoffwechsel wie nach Ausdauertraining wäre demnach eine vermehrte Expression der phosphorylierten Form bei den sportlich aktiven Tieren zu erwarten gewesen.

4.3 Gene und Proteine mit stabiler Expression bei Laufradtraining ohne Geschlechterunterschiede

Die Auswertung der Ergebnisse der Proteinexpression von PPAR α ergab keine signifikanten Unterschiede, weder innerhalb der Geschlechter noch zwischen der Kontroll- und Ausdauergruppe. Ebenfalls konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genexpression ermittelt werden. Da PPAR α weder als Protein noch als mRNA vermehrt vorlag, kann von einer gesteigerten Expression im untersuchten Gewebe abgesehen werden (s. Abbildung 7 und 13a).

Der Transkriptionsfaktor PPAR α (wie auch sein Kofaktor PGC-1 α) gilt als spezifischer Regulator der Energiegewinnung im Fettstoffwechsel und kontrolliert katabole Abbauvorgänge über direkte Kontrolle der Expression von Schlüsselenzymen. Aus der Literatur ist bekannt, dass PPAR α nach sportlicher Betätigung und Perioden mit Nahrungskarenz als Auslöser für die Energiegewinnung stärker exprimiert vorliegt [33].

Einen deutlichen Anstieg an Genen, die in die ATP-Gewinnung durch Fettsäuren involviert sind, zeigten Strom et.al mit Untersuchungen an „Microarray“ Analysen [5]. Die Tiere absolvierten hier ein siebenwöchiges stressbedingtes Ausdauertraining. Über die Gen- oder Proteinexpression der PPARs wurde hier keine Aussage getroffen.

Einen deutlichen Anstieg der mRNA- und Proteinexpression von PPAR α konnte die Arbeit von Iemitsu et al. in einem Tierversuch an Ratten unter Ausdauerbelastung zeigen [16]. Es zeigte sich eine geringere PPAR α -Expression im myokardialen Gewebe bei der nicht durch Ausdauer belasteten Kontrollgruppe (23 Monate) als in der Gruppe der jüngeren Tiere (vier Monate) und der jungen Tiere (vier Monate), die ein Schwimmtraining in einem Zeitraum von acht Wochen absolvierten [16]. Diese Untersuchungen zeigen, dass nicht nur der Zeitraum des Ausdauertrainings, sondern auch das Alter der Tiere Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren im Fettsäuremetabolismus nehmen.

Ebenfalls konnten keine signifikanten Veränderungen der Expression bei der Proteinexpression des Transkriptionsfaktors PPAR γ festgestellt werden. Es zeigten sich weder Unterschiede zwischen den Geschlechtern noch zwischen Ausdauer - und Kontrollgruppen. Ebenfalls konnten keine Veränderungen bei der Untersuchung der mRNA festgestellt werden (s. Abbildung 9 und 13c).

Es ist bislang bekannt, dass PPAR γ eine Schlüsselrolle im Metabolismus des Fettgewebes einnimmt [26, 35] und die Aufnahme von Fettsäuren in Adipozyten beeinflusst. Auch scheint PPAR γ an Glukosestoffwechselfvorgängen beteiligt zu sein [25].

Bislang konnte der Transkriptionsfaktor in Gefäßwänden sowie in Skelett- und Herzmuskulatur nachgewiesen werden [25]. Noch ist aber die Beteiligung von PPAR γ an molekularen Vorgängen im Myokard unzureichend verstanden [25].

Nach einem Ausdauerstimulus wäre ein gesteigerter kardialer Fettsäurestoffwechsel zu erwarten gewesen. Dies hätte auch eine mögliche verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors zeigen können. Eine mögliche Erklärung der fehlenden signifikanten Unterschiede könnte auch bei PPAR γ der Zeitraum der Laufperiode gewesen sein (s. Abschnitt 4.4).

Aus anderen tierexperimentellen Studien ist auch bekannt, dass der Transkriptionsfaktor besonders nach Myokardinfarkt stärker exprimiert wird [25]. Da bei einem Myokardinfarkt ebenfalls die Rate der Fettsäureoxidation vermindert ist, spricht diese gesteigerte PPAR γ -Expression für eine mögliche Kompensation, um den Fettsäurestoffwechsel zu verbessern [25]. Wird aber durch ein mögliches erreichtes Stoffwechselgleichgewicht keine gesteigerte

Fettsäureoxidation benötigt, kann dies fehlende Signifikanzen im physiologischen Hypertrophiemodell erklären.

Die nachfolgenden Regulatoren des Fettsäure -und Glukosemetabolismus wurden ausschließlich auf m-RNA-Ebene untersucht, da ihre Expression durch die PPARs reguliert wird. Somit kann die Genexpression des jeweiligen Zielgens als ein indirektes Maß für die Aktivität der PPARs angesehen werden.

Keine signifikanten Unterschiede in der Expression gab es bei der Untersuchung der Lipoproteinlipase (LPL). Es zeigten sich weder Expressionsunterschiede zwischen den Geschlechtern noch zwischen Ausdauer - und Kontrollgruppe (s. Abbildung 14a).

Bereits bekannt ist, dass sportliche Aktivität die Lipoproteinlipase (LPL) -Aktivität im Skelettmuskel stimuliert [58]. Ebenfalls ist bekannt, dass die Ausprägung der LPL-Expressionen zwischen den einzelnen Organen variiert. Die höchsten Levels an Genexpressionen von LPL sind sowohl im Fettgewebe und in laktierendem Drüsengewebe der Brust, als auch aus dem kardialen Muskelgewebe bekannt [59]. Am kardialen Endothel werden die Triacylglycerine als wichtige Energieträger aus dem Serum zu freien Fettsäuren und Glycerin gespalten [41]. Da Fettsäuren für den Herzmuskel zur Deckung des Energiebedarfs sehr wichtige Energielieferanten darstellen, wird die LPL hier verstärkt exprimiert. Durch Ausdauerleistung steigt der Energiebedarf, und es ist deshalb anzunehmen, dass in Folge dessen auch die LPL vermehrt exprimiert vorliegt. Warum es in den physiologisch hypertrophen Herzen der Tiere der Ausdauergruppe zu keiner Veränderung der Expression kam, wirft wieder die Frage des Zeitraumes der Laufperiode auf. Wahrscheinlich war zum Untersuchungszeitpunkt bereits eine Kompensation des anfänglich gesteigerten Stoffwechsels eingetreten.

Es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression des Membranproteins CD36 festgestellt werden. Es zeigten sich weder Unterschiede zwischen den Geschlechtern noch zwischen Ausdauer - und Kontrollgruppe. Zu beachten ist dabei aber, dass nur die Genexpression nicht aber die intrazelluläre Lokalisation von CD36 untersucht wurde (s. Abschnitt 4.4.2).

Das Membranprotein CD36 ist ein Transporter, der die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in kardiale Myozyten erleichtert [60]. Aus der Literatur ist bekannt, dass es in

Folge einer verringerten Expression des Transporters zu einer geringeren Fettsäureaufnahme in die Zelle [51] und damit leichter zu einer Lipidakkumulation im Herzen kommt [60].

So zeigten spontan hypertensive Ratten eine verminderte Rate von CD36-Transportern, was die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren erschwerte [51]. Anzunehmen ist, dass in einem Organismus mit gesteigerter Fettsäureverwertung, wie nach Ausdauertraining, die Genexpression von CD36-Transportern signifikant erhöht wäre. Bekannt ist ebenfalls, dass eine gesteigerte Kontraktilität die Translokation von intrazellulär gespeicherten CD36-Anlagen zur Plasmamembran erhöhen [61]. Dies ist für eine gesteigerte Aufnahme von langkettigen Fettsäuren nötig [61]. Sehr häufige Verlagerung des Transporters führt aber auch zu einer Anhäufung von Fetten und anderen Metaboliten, was wiederum zur Beeinträchtigung der Kontraktilität führen kann [44].

Iemitsu et al. konnten in einem Tiermodell mit physiologisch entwickelter Hypertrophie die mRNA Expression des Faktors CD36 nachweisen, es gab aber in der Expression kaum Unterschiede zur nicht belasteten Kontrollgruppe [51]. Möglicherweise wird die CD36 Expression durch das physiologische Wachstum nicht so stark reguliert wie angenommen und wird eher in der pathologischen Hypertrophie vermindert exprimiert.

Ebenfalls von Interesse ist hierbei die Arbeit von Strom et al., die an 24 Wochen alten Ratten nach einem Laufband-Ausdauertraining keine Veränderung der CD36 Expression im Herzen in physiologischer Hypertrophie mittels RT-PCR zeigen konnte [5]. Möglicherweise ist, was die Genexpression von CD36 betrifft, eher von keiner Steigerung bei adaptativer kardialer Hypertrophie auszugehen. Dabei könnte auch hierbei der Zeitraum der Laufperiode von fünf Wochen entscheidend für die Expression des Transkriptionsfaktors gewesen sein. Damit wäre durch eine bereits eingetretene Kompensation die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren für das Energieniveau nicht nötig gewesen wäre.

Zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpression kam es bei der Untersuchung der „*carnitine- palmytoyltransferase 1*“ (CPT1). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Ausdauergruppe beobachtet. Ebenfalls gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren (s. Abbildung 14c).

Bei CPT1 handelt es sich um ein Enzym, welches an der äußeren Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Es katalysiert die Kopplung von langkettigen Fettsäuren an L-Carnitin, was diese in das Mitochondrium transportiert [29, 62]. Übereinstimmend mit den Beobachtungen dieser Arbeit stellten auch Iemitsu et al. keine Veränderungen der Genexpression von CPT1 im Rattenmodell nach Ausdauerbelastung fest

[51]. Interessanterweise zeigte sich dabei aber eine signifikant erhöhte Expression der mRNA des Enzyms CPT2 in den Ratten mit physiologischer Hypertrophie [51]. Das Enzym CPT2 liegt an der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran und überträgt die Fettsäure des Acyl-Carnitin auf Coenzym A; Acyl-CoA entsteht, und Carnitin wird regeneriert [41]. Dies ist ein wichtiger Schritt innerhalb der Energiegewinnung durch Fettsäuren. Der Vorgang der „*carnitin-palmytoyltransferase 2*“ (CPT2) folgt dem der „*carnitine- palmytoyltransferase 1*“ (CPT1) in der Zelle. Anzunehmen ist jedoch, dass durch einen gesteigerten Fettstoffwechsel auch die CPT1 signifikant nach Ausdauer gesteigert wäre, da beide Schritte eine Schlüsselrolle als Enzymregulatoren im Fettsäurestoffwechsel innehaben [51].

Diese Arbeit untersuchte ebenfalls mögliche Veränderungen der mRNA-Expression der „*Cytocrome Oxidase 5A*“ (=COX5A). Es zeigte sich auch hier eine stabile Expression nach Ausdauerbelastung zwischen der Kontroll- und der Ausdauergruppe. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren (s. Abbildung 14e).

Die Cytochromoxidase (COX) ist ein mitochondriales Enzym der Atmungskette, welches an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist [63]. Sie besteht aus dreizehn Untereinheiten, wovon diese Arbeit die kleinere Untereinheit Cytochromoxidase 5A untersucht hat [63].

COX scheint als mitochondriales Enzym eine Rolle in der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie innezuhaben [63]. Da andere Arbeitsgruppen einen Abfall der COX-Expression im anfänglichen Stadium eines Herzversagens zeigen konnten [63], ist die gemessene stabile Expression bei physiologischer Hypertrophie möglicherweise als Ausdruck eines physiologisch regulierten Stoffwechsels zu verstehen.

Als Bestandteil des Glukosemetabolismus wurden die Transporter Glut1 und Glut4 auf Veränderungen der mRNA-Expression untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Glukosetransporter zwischen der Kontroll- und der Ausdauergruppe festgestellt werden. Es zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren (s. Abbildung 15a-b).

In kardialen Muskelzellen fungieren die Glukosetransporter Glut1 und Glut4 für die Aufnahme von Glukose als Energieträger [44].

Von der pathologisch kardialen Hypertrophie ist bekannt, dass es zu einer verstärkten Aufnahme von Glukose als Energie-Ressource kommt [64]. Dies konnte bei einer physiologischen Hypertrophie bislang nicht festgestellt werden [18].

Bei einem gesteigerten Energieumsatz, wie bei den Tieren der Ausdauergruppe, wäre ein verstärkter Fettstoffwechsel zu erwarten. Eine fehlende Steigerung der Expression des Glukosetransporters entspricht demnach den bekannten Daten.

Eine gesteigerte Glukoseaufnahme ist als Zeichen der kardialen Energiegewinnung in der pathologischen Hypertrophie bekannt [64]. Diese Art der Energiegewinnung entspricht der fetalen Energiegewinnung in der Entwicklung des Menschen, eine Fähigkeit, auf die der Körper im Bedarfsfall bei pathologischen Belastungen des Herzens zurückkehren kann [39]. Dies ist bei der physiologischen Hypertrophie nicht anzunehmen, vielmehr sind bei nicht belasteten Herzen verminderte Expressionen der Glukosetransporter 1 und 4 bekannt [39].

Da es bei einer physiologischen Hypertrophie zu einer positiven Belastung im Gesamten kommt [65], hätte zusätzlich zu einem gesteigerten Fettstoffwechsel eine verminderte Expression der Glukosetransporter denkbar sein können.

4.4 Geringfügige Expressionsänderungen - Bedeutung des Untersuchungszeitpunktes

In dieser Arbeit wurden Faktoren des myokardialen Stoffwechsels untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Ausprägung geschlechtsspezifischer Unterschiede. Es ist bereits bekannt, dass es nach körperlicher Ausdauerleistung zu einer Steigerung des Fettsäurestoffwechsels zur moderaten Deckung des erhöhten Energiebedarfs kommt. Deshalb wurde nach einem fünfwöchigen Ausdauertraining eine deutliche Steigerung der untersuchten Gene und Proteine des kardialen Fettsäurestoffwechsels erwartet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber nur wenige Unterschiede in der Ausprägung der Gen- und Proteinexpressionen der untersuchten Faktoren des kardialen Stoffwechsels. Dies traf sowohl auf die Abhängigkeit des Geschlechts, als auch auf die kardiale Reaktion des physiologischen Stimulus des Laufradtrainings zu.

Eine entscheidende mögliche Begründung der fehlenden signifikanten Unterschiede wurde sehr wahrscheinlich durch die Wahl des Untersuchungszeitpunktes verursacht (s. Abschnitt 4.5.).

Möglicherweise befanden sich die Tiere aber in genau diesem Zeitraum in einem sog. „*steady state*“ Stoffwechselverhältnis. Für einen solchen Zustand ist bekannt, dass es während einer Belastung zwar anfänglich zu einem Anstieg der Herzfrequenz kommt, dieser aber ab einem erreichten Leistungspunkt nicht mehr überschritten wird. Somit kann die Belastung über viele Stunden bis hin zu Wochen geleistet werden [66]. Die Ausdauerleistung wäre demnach eher

dem „Freizeitsport“ als dem Leistungssport zuzuweisen. Zusätzlich kam die Ausdauerleistung ohne Stressbelastung zustande.

Befanden sich die Tiere genau zum Zeitpunkt der Messung in einem genannten „*steady state*“ Stoffwechselverhältnis, hätte eventuell zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt der Messung eine deutlichere Aussage über die Veränderungen der einzelnen Faktoren des Fettstoffwechsels getroffen werden können. Es wäre demnach eine Kompensation des gesteigerten Stoffwechsels bereits eingetroffen, und die Ausdauerleistung hätte die Kapazität des kardiovaskulären Systems erhöht.

Bekannt ist, dass neben einer vergrößerten kardialen Masse sich auch die Sauerstoff-Ausschöpfung und die Anzahl der Mitochondrien kompensatorisch steigern [5]. Ein anfänglich gesteigerter Fettstoffwechsel, der sich im Verlauf wieder reguliert, wäre somit denkbar.

Hinweise bezüglich eines zeitlichen Verlaufs von Genexpressionen konnten auch von Weinberg et al. in Mausmodellen zu Untersuchungen in pathologischer Hypertrophie festgestellt werden [67]. So zeigte sich, dass eine große Anzahl an Genen als Antwort auf akute Hochdruckbelastung (nach einem Tag) im Herzen reguliert wurden, die Mehrheit der Gene aber zu einem späteren Zeitpunkt (nach 30 Wochen) weniger stark nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren wurden neben den zeitlich bedingten Unterschieden auch geschlechterabhängige Regulationen einzelner Gene festgestellt [67].

Ebenfalls zeigten Konhilas et al. zeitabhängige Veränderungen bei der Untersuchung von Proteinexpressionen in physiologischer Hypertrophie. Es zeigte sich, dass die Proteinexpressionen gemessener Transkriptionsfaktoren signifikant nach sieben Tagen der Ausdauerleistung, sowohl bei weiblichen und männlichen Mäusen anstiegen. Nach drei Wochen waren sie aber wieder auf das Niveau der nicht belasteten Tiere gesunken [50].

Diese Untersuchungen zeigen damit deutliche Veränderungen zwischen einem frühen und einem späten Zeitpunkt der Messung. Diese Beobachtungen beziehen sich sowohl auf die pathologische, als auch auf Untersuchungen zur physiologischen Hypertrophie.

Weitere Erklärungsmodelle für die nur teilweise festgestellten signifikanten Unterschiede in Gen- und Proteinexpressionen sind in den folgenden Abschnitten angeführt.

4.4.1 Wahl der Zielgene

Die Wahl der Zielgene in dieser Arbeit stellt nur einen kleinen Ausschnitt aus dem Hypertrophie-Programm dar. Sie erfolgte aufgrund der vorliegenden Literatur. Dennoch konnten die vorliegenden Ergebnisse in dieser Arbeit bereits anerkannte Hypothesen aber nur

teilweise bestätigen. In diesem Zusammenhang zeigten Mikroarray-Untersuchungen bereits, dass eine viel größere Zahl an Genen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, reguliert wird [5]. So bewiesen Mikroarray-Analysen die Regulation mehrerer hundert verantwortlicher Gene in Antwort auf Ausdauerleistung und physiologischer Hypertrophie [5]. Die veränderten Expressionen betrafen dabei vorwiegend die Gene, welche im Fett- und Glukosestoffwechsel eine entscheidende Rolle spielten [5]. Hierbei wurde der direkte Vergleich zur pathologischen Hypertrophie gezogen, in dem ausgewählte Gene beider Hypertrophieformen mittels der PCR-Methode im Anschluss an Mikroarray-Analysen untersucht wurden [5]. Es zeigte sich, dass insbesondere Gene, welche in die mitochondriale β -Oxidation involviert sind (z.B. CD36), dabei verstärkt nachgewiesen werden konnten. Damit ließ sich ein deutlicher Unterschied zur pathologisch erworbenen kardialen Hypertrophie nachweisen [5]. Dies zeigt, dass die Wahl der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene wichtige Modulatoren im Fett- und Glukosestoffwechsel darstellen und in der physiologischen Hypertrophie stärker exprimiert werden. Für zukünftige Untersuchungen könnten daher neue Gene vermehrt an Interesse gewinnen.

4.4.2 Mechanismen der Regulation

Mögliche Veränderungen im Stoffwechsel sind mittels der Methoden der Real-Time PCR und des Western Blot-Verfahrens untersucht worden. Signifikanzen konnten dabei nur bei wenigen untersuchten Proteinexpressionen festgestellt werden (s. Abschnitt 4.2.). Andererseits zeigten sich in der Auswertung Trends zu relativ kleinen 10-15%igen Veränderungen, die aber nicht signifikant waren. Die Signifikanz von 10-15%igen Veränderungen im Stoffwechsel ist mit obig genannten Methoden schlecht nachweisbar, da sie im Streubereich der Methodik liegen. Andererseits können in dem sehr eng kontrollierten kardialen Energiestoffwechsel Veränderungen dieser Größenordnung von aneinander gekoppelten Genen große Bedeutung besitzen. So konnten Untersuchungen Veränderungen dieser Größenordnung in Mikroarray-Analysen im Mausmodell nachweisen. Es handelte sich um Tiere nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC) von neun Wochen nach Intervention. Dabei konnten Geschlechterunterschiede in der globalen Genexpression nachgewiesen werden. Weibliche Tiere zeigten eine geringere Reduktion an Genen der oxidativen Phosphorylierung als die männliche Vergleichsgruppe (Dissertation Daniela Fliegner/Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Vera Regitz-Zagrosek).

4.4.3 Stoffwechselregulationen durch Enzymaktivitäten anstelle von Gen- und Proteinexpression

Diese Arbeit hat sich aus Zeitgründen auf die Regulation der Gen- und Proteinexpression beschränkt. Es ist jedoch bekannt, dass einige der beteiligten Enzyme und Transporter nicht nur durch Veränderungen in der Expression reguliert werden.

So ist bekannt, dass das Membranprotein CD36, auch „*long-chain fatty acid*“ (LCFA) Transporter genannt, vor allem durch seine intrazelluläre Lokalisation reguliert wird. Durch Translokation des CD36/ LCFA Transporters von intrazellulär zur Plasmamembran (=Sarkolemm) im Herzmuskel kommt es zu einer gesteigerten Aufnahme von langkettigen Fettsäuren, die ein Hauptenergeträger im Herzen sind [44]. Da diese Arbeit nur die Genexpression des Membranproteins CD36 gemessen hat, nicht aber seine intrazelluläre Lokalisation, kann diese Enzymaktivität nicht bewertet werden.

Auch die Serin-Threoninkinase „Akt“ wird über Phosphorylierung kontrolliert, wobei diese an verschiedenen Stellen möglich ist [57]. In dieser Arbeit wurden die Proteinexpression von Akt und p-Akt gemessen. Aus Zeitgründen wurden keine weiteren Untersuchungen gemacht, an welcher der möglichen Stellen Akt phosphoryliert wurde. Dies ist sowohl an einem Threonin- als auch an einem Serinrest möglich [57].

Aus Zeitgründen wurden auch keine der weiteren intranukleären Transkriptionsfaktoren bzw. Bindungspartner von aktiviertem Akt, wie z.B. Forkhead oder GSK3 bestimmt [47, 57]. Sowohl der Ort der Phosphorylierung als auch die Expression der Bindungspartner hätten weitere Einblicke in den Fettstoffwechsel bei physiologischer Hypertrophie geben können.

4.5 Einschränkungen

Bei der Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation müssen folgende Einschränkungen Beachtung finden: Bei Übernahme des Themas dieser Dissertation war der Tierversuch, dessen Myokardproben im Folgenden ausgewertet wurden, bereits abgeschlossen (s. Abschnitt 2.2.1. und s. Abschnitt 3.1.). Daraus ergab sich für die Messung der Gen- und Proteinexpressionen nur ein möglicher Zeitpunkt nach einer fünfwöchigen Laufperiode der Tiere, welcher ausgewertet werden konnte. Ebenfalls wurde in dieser Arbeit nur ein begrenztes Spektrum an Genen und Proteinen des Fett- und Glukosestoffwechsels betrachtet, die damit nur einen limitierten Überblick in die Stoffwechselsituation der Tiere geben können.

Die Auswahl der Zielgene erfolgte auf Grund der vorliegenden Literatur. Deshalb können mit den Ergebnissen in dieser medizinischen Dissertation nur Aussagen unter den oben genannten Einschränkungen getroffen werden.

4.6 Bedeutung der Befunde - Schlussfolgerung

Es konnte die stärkere Expression von PGC-1 α bei den weiblichen Tieren im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe bestätigt werden.

Ebenfalls gab es Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Regulation von Akt. Hierbei war Akt bei den weiblichen Tieren der Kontrollgruppe in einem stärkeren Maße vorhanden als bei der männlichen Kontrollgruppe.

Eine signifikant verminderte Proteinexpression von PPAR β/δ konnte bei den weiblichen Tieren nach Ausdauertraining zur Kontrollgruppe der weiblichen Tiere bestätigt werden.

Darüber hinaus zeigten sich keine höhergradigen Veränderungen für Gen- und Proteinexpressionen im Energiestoffwechsel mittels der angewandten Methoden.

Gründe dafür könnten sein, dass sich Teile der Stoffwechselregulationen auf Ebene der Enzymaktivität (s. Abschnitt 4.4.3.) abspielen. Auch kommt der Untersuchungszeitpunkt (s. Abschnitt 4.5.) für die fehlenden signifikanten Expressionen in Frage. Des Weiteren kann es sein, dass eine physiologisch erworbene Hypertrophie gar nicht in dem Maße in die Balance des Stoffwechsels eingreift wie erwartet, da es sich bei den Tieren um „Freizeitsportler“ handelte, die das Training in Zeitpunkt und den Umfang ihrer Ausdauerleistung selbst bestimmten. So musste möglicherweise nur eine „normale“ Balance von den untersuchten Expressionsfaktoren aufrechterhalten werden [51].

Anzunehmen ist, dass die Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen groß genug war, um Abweichungen statistisch signifikant (p-Wert <0,05) messen zu können. Ebenfalls wurde zu Beginn der Messungen eine mRNA-Qualitätskontrolle mittels des Bioanalyzers durchgeführt. Diese Methode entspricht ebenso wie die real-time PCR und das Western Blot-Verfahren dem aktuellen Standard.

Abschließend kann aber, besonders im Zusammenhang mit schon bekannten Arbeiten, von einer veränderten Fett- und Glukosestoffwechselsituation in physiologischer Hypertrophie ausgegangen werden. Des Weiteren gibt es ebenfalls Hinweise auf Verbindungen zwischen dem Geschlecht und der unterschiedlichen Ausprägung von physiologischer Hypertrophie.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression von Faktoren des Fett- und Glukosestoffwechsels im Rahmen von physiologisch myokardialer Hypertrophie untersucht. Da bei der pathologisch kardialen Hypertrophie eine veränderte kardiale Energiegewinnung bereits bekannt ist, sollte die Hypothese einer Steigerung des Fettsäurestoffwechsels der kardialen Energiegewinnung bei physiologisch erworbener Hypertrophie belegt werden.

In einem Tiermodell mit Mäusen wurden folgende Gene des Fettstoffwechsels auf mRNA Ebene untersucht: PPAR (α ; β/δ ; γ); PGC-1 α ; LPL; CD36; CPT1; MCAD und COX5A. Für den Glukosestoffwechsel wurden die Expressionsraten der Glukosetransporter Glut1 und Glut4 herangezogen. Auf Ebene der mRNA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Ausdauergruppe. Geschlechterunterschiede wurden hier nicht beobachtet. Mittels des Western Blot-Verfahrens wurden die Proteine von PPAR (α ; β/δ ; γ), des PPAR-Kofaktors PGC-1 α sowie Akt und p-Akt untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Proteine von PPAR α und γ . Bei der Untersuchung von PPAR β/δ wurde eine verminderte Expression der Proteine der weiblichen Ausdauergruppe gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe deutlich. Bei dem PPAR-Kofaktor PGC-1 α lag eine höhere Expression des Transkriptionsfaktors bei den weiblichen Kontrolltieren im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren vor. Diese Feststellung traf auch für die Expression des Proteins Akt zu. Bei der Untersuchung der Proteinexpressionen zwischen Akt und p-Akt stellte sich eine signifikant geringere Ausgangsexpression heraus. Dies betraf die weiblichen Kontrolltiere im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren. Insgesamt konnten so veränderte Expressionen für bestimmte Proteine aufgezeigt werden, ebenfalls wurden dabei einige Geschlechterunterschiede festgestellt.

Literaturverzeichnis

1. Tamura, T., S. Said, and A.M. Gerdes, *Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure*. Hypertension, 1999. **33**(2): p. 676-80.
2. Herold, D.m.G., *Innere Medizin*. 2008, Köln: Dr.med.Gerold Herold. 895.
3. Witt, H., et al., *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice*. J Mol Med, 2008. **86**(9): p. 1013-24.
4. Regitz-Zagrosek, V., *Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(5): p. 425-38.
5. Strom, C.C., et al., *Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy*. Febs J, 2005. **272**(11): p. 2684-95.
6. Kong, S.W., et al., *Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats*. Physiol Genomics, 2005. **21**(1): p. 34-42.
7. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. Georg Thieme Verlag. 2003. 552.
8. Dorn, G.W., 2nd and T. Force, *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 527-37.
9. de las Fuentes, L., et al., *Myocardial fatty acid metabolism: independent predictor of left ventricular mass in hypertensive heart disease*. Hypertension, 2003. **41**(1): p. 83-7.
10. DeBosch, B., et al., *Akt1 is required for physiological cardiac growth*. Circulation, 2006. **113**(17): p. 2097-104.
11. Catalucci, D., et al., *Physiological myocardial hypertrophy: how and why?* Front Biosci, 2008. **13**: p. 312-24.
12. Kiec-Wilk, B., et al., *The selected pathophysiological aspects of PPARs activation*. J Physiol Pharmacol, 2005. **56**(2): p. 149-62.
13. Lips, D.J., et al., *Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy*. Eur Heart J, 2003. **24**(10): p. 883-96.
14. Lehman, J.J. and D.P. Kelly, *Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(4): p. 339-45.

15. Watson, P.A., et al., *Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H246-59.
16. Iemitsu, M., et al., *Aging-induced decrease in the PPAR-alpha level in hearts is improved by exercise training*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1750-60.
17. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 547-55.
18. McMullen, J.R., et al., *Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 612-7.
19. Jamshidi, Y., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension*. Circulation, 2002. **105**(8): p. 950-5.
20. Barish, G.D., V.A. Narkar, and R.M. Evans, *PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 590-7.
21. Lehman, J.J. and D.P. Kelly, *Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(2): p. 175-85.
22. Rupp, H., T.P. Rupp, and B. Maisch, *[Metabolism and the hypertrophied heart of the elderly]*. Dtsch Med Wochenschr, 2005. **130**(12): p. 726-30.
23. Finck, B.N., *The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 269-77.
24. Planavila, A., R.R. Calvo, and M. Vazquez-Carrera, *Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of fatty acid oxidation in cardiac hypertrophy*. Mini Rev Med Chem, 2006. **6**(3): p. 357-63.
25. Fliegner, D., et al., *Up-regulation of PPARgamma in myocardial infarction*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(1): p. 30-8.
26. Kelly, D.P., *PPARs of the heart: three is a crowd*. Circ Res, 2003. **92**(5): p. 482-4.
27. Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation*. Inflamm Res, 2000. **49**(10): p. 497-505.

28. Corton, J.C., S.P. Anderson, and A. Stauber, *Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000. **40**: p. 491-518.
29. Barger, P.M. and D.P. Kelly, *PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism*. *Trends Cardiovasc Med*, 2000. **10**(6): p. 238-45.
30. Flavell, D.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease*. *Circulation*, 2002. **105**(12): p. 1440-5.
31. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Nuclear receptor signaling and cardiac energetics*. *Circ Res*, 2004. **95**(6): p. 568-78.
32. Pischon, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 P12A polymorphism and risk of coronary heart disease in US men and women*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1654-8.
33. Feige, J.N., et al., *From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions*. *Prog Lipid Res*, 2006. **45**(2): p. 120-59.
34. Yu, S. and J.K. Reddy, *Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(8): p. 936-51.
35. Semple, R.K., V.K. Chatterjee, and S. O'Rahilly, *PPAR gamma and human metabolic disease*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 581-9.
36. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2007. **75**(3): p. 478-86.
37. Djouadi, F., et al., *A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(6): p. 1083-91.
38. Hsieh, Y.C., et al., *PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(6): p. H2665-72.
39. Rajabi, M., et al., *Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis*. *Heart Fail Rev*, 2007. **12**(3-4): p. 331-43.
40. Koves, T.R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training*

- and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency.* J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33588-98.
41. Löffler, G., Petrides, Pedro E., *Biochemie und Pathobiochemie.* Vol. 7. 2003, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 1267.
 42. Abel, E.D., *Glucose transport in the heart.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 201-15.
 43. Miura, S., et al., *Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles.* J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31385-90.
 44. Schwenk, R.W., et al., *Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 249-58.
 45. Slot, J.W., et al., *Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7815-9.
 46. Belke, D.D., et al., *Glucose metabolism in perfused mouse hearts overexpressing human GLUT-4 glucose transporter.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(3): p. E420-7.
 47. Camper-Kirby, D., et al., *Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males.* Circ Res, 2001. **88**(10): p. 1020-7.
 48. DeBosch, B., et al., *Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival.* J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32841-51.
 49. Sakamoto, K., et al., *Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(5): p. E1081-8.
 50. Konhilas, J.P., et al., *Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(6): p. H2768-76.
 51. Iemitsu, M., et al., *Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism.* Hypertens Res, 2003. **26**(10): p. 829-37.
 52. Iemitsu, M., et al., *Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **281**(6): p. R2029-36.
 53. Genomics, C.f.F., et al.
 54. Luquet, S., et al., *Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome.* Biochimie, 2004. **86**(11): p. 833-7.

55. Gilde, A.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism.* Circ Res, 2003. **92**(5): p. 518-24.
56. Burkart, E.M., et al., *Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart.* J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3930-9.
57. Sugden, P.H. and A. Clerk, *Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease.* Circ Res, 2001. **88**(10): p. 975-7.
58. Vaziri, N.D., K. Liang, and C.H. Barton, *Effect of increased afterload on cardiac lipoprotein lipase and VLDL receptor expression.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1436**(3): p. 577-84.
59. Enerback, S. and J.M. Gimble, *Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1169**(2): p. 107-25.
60. Yang, J., et al., *CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy.* Circ Res, 2007. **100**(8): p. 1208-17.
61. Koonen, D.P., et al., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1736**(3): p. 163-80.
62. Königshoff, M., Brandenburger, Timo, *Kurzlehrbuch Biochemie.* 2004: Thieme Verlag. 450.
63. Kuo, W.W., et al., *The profile of cardiac cytochrome c oxidase (COX) expression in an accelerated cardiac-hypertrophy model.* J Biomed Sci, 2005. **12**(4): p. 601-10.
64. Liao, R., et al., *Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice.* Circulation, 2002. **106**(16): p. 2125-31.
65. Andersen, J.B., et al., *Physiology: postprandial cardiac hypertrophy in pythons.* Nature, 2005. **434**(7029): p. 37-8.
66. Rainer Klinke, S.S., *Lehrbuch der Physiologie.* 3 ed. Vol. 1. 2001: Georg Thieme Verlag. 841.
67. Weinberg, E.O., et al., *Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload.* Physiol Genomics, 2003. **12**(2): p. 113-27.

Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr.med.Vera Regitz-Zagrosek für die sehr gute Betreuung und die Möglichkeit, die Thematik meiner Dissertation in ihrem Labor bearbeiten zu dürfen. Gleichwohl möchte ich ihr für die wissenschaftliche Ausbildung und die vielen Diskussionen in Arbeitsgruppen- und Laborbesprechungen danken.

Des Weiteren bin ich Frau Dr. Carola Schubert zu sehr tiefem Dank verpflichtet, da sie mir zu jeder Zeit inhaltlich und praktisch als Betreuerin zur Seite stand und mir bei jeder meiner Fragestellungen weitergeholfen hat.

Ebenso danke ich den Tiermedizinerinnen Nadine Ehrenberg und Kathleen Cantow, die das Tiermodell, auf dem diese Arbeit beruht, betreut haben. Auch gilt mein Dank den Teilnehmern der PPAR Arbeitsgruppe Frau Dr. Carola Schubert, Frau Dr. Eva Becher, Frau Daniela Fliegner und Frau Hannah Hampel für die angeregten Diskussionen zum Thema.

Ebenfalls möchte ich Frau Jenny Thomas danken, die mir die technischen Arbeiten im Labor wunderbar erklärt hat und von der ich sehr viel gelernt habe. Ebenfalls danke ich auch Frau Britta Fielitz und Frau Anja Angelov für die technische Unterstützung. Vielen Dank auch an Frau Hang Pham, ohne die mein Computer nicht mehr funktionieren würde. Mein Dank gilt auch den anderen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Vera Regitz-Zagrosek für viele weitere Anregungen und Hilfestellungen.

Zuletzt möchte ich den Menschen in meinem persönlichen Umfeld danken, die mich in allen meinen Vorhaben immer rückhaltlos unterstützten. Besonderer Dank gilt auch meinem Freund Jonas Busch, der mein wissenschaftliches Arbeiten während meines Medizinstudiums immer mit vielen positiven Anregungen bereichert hat.

Erklärung

„Ich, Marjam Rittermann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema 'Geschlechterunterschiede im kardialen Metabolismus bei physiologischer Hypertrophie' selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

