

Aus dem  
CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften (CC 1)  
Institut für Geschlechterforschung in der Medizin  
Direktorin (bis 31.03.2019): Prof. Dr. med. Dr. hc. Vera Regitz-Zagrosek  
Wissenschaftliche Centrumsleitung: Univ. – Prof. Dr. phil. Adelheid Kuhlmeiy

## **Habilitationsschrift**

# **Die Rolle von 17 $\beta$ -Östradiol und der Östrogenrezeptoren bei der geschlechtsspezifischen Regulation kardialer Umbauprozesse**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. medic. Elke Dworatzek

Eingereicht: Mai 2019

Dekan: Univ. - Prof. Dr. med. Axel R.-Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland, Mannheim

2. Gutachterin: Prof. Dr. Kristina Lorenz, Würzburg

**Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Erkrankungen des Herz- Kreislauf- Systems.....	1
1.2 Kardiale Umbauprozesse.....	2
1.3 Die kardiale Fibrose .....	4
1.4 Kardiale Umbauprozesse sind geschlechtsspezifisch .....	5
1.4.1 Geschlechterunterschiede bei physiologischen kardialen Umbauprozessen.....	6
1.4.2 Geschlechterunterschiede bei pathologischen kardialen Umbauprozessen .....	7
1.5 Rolle von 17 $\beta$ - Östradiol bei kardialen Umbauprozessen.....	8
1.5.1 Rolle von 17 $\beta$ - Östradiol bei physiologischen kardialen Umbauprozessen.....	9
1.5.2 Rolle von 17 $\beta$ -Östradiol bei pathologischen kardialen Umbauprozessen .....	9
1.6 Rolle der Östrogenrezeptoren bei kardialen Umbauprozessen .....	11
1.6.1 Rolle der Östrogenrezeptoren bei pathologischen kardialen Umbauprozessen .....	13
1.6.2 Effekte von Östrogen und Östrogenrezeptoren in kardialen Fibroblasten .....	15
1.7 Zielstellung .....	17
<b>2 Eigene Arbeiten</b> .....	<b>18</b>
2.1 Geschlechterunterschiede in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie sind durch den Östrogenrezeptor beta moduliert .....	18
2.2 Maladaptive Umbauprozesse in Herzen von Frauen mit Aortenstenose sind mit einer erhöhten Sterberate nach Aortenklappenersatz assoziiert .....	31
2.3 Geschlechtsspezifische Regulation Fibrose- und Inflammations- assoziierter Gene im humanen linken Ventrikel von Patienten und Patientinnen mit Aortenstenose ...	41
2.4 Effekt des Alterns auf die kardiale extrazelluläre Matrix in Männern und Frauen ....	51
2.5 Die geschlechtsspezifische Regulation der Expression von Kollagen I und III durch 17 $\beta$ - Östradiol in kardialen Fibroblasten: Rolle der Östrogenrezeptoren .....	60
<b>3 Diskussion</b> .....	<b>75</b>
3.1 Geschlechterunterschiede in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie sind durch die geschlechtsdimorphe Aktivierung zellulärer Signalkaskaden vermittelt .....	75

3.2	Geschlechterunterschiede in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie werden durch Östrogenrezeptor beta vermittelt .....	77
3.3	Östrogenrezeptor beta vermittelt die geschlechtsdimorphe Adaption der Mitochondrien in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie....	78
3.4	Die altersbedingten kardialen Umbauprozesse sind durch eine geschlechtsspezifische Regulation der extrazellulären Matrix gekennzeichnet .....	79
3.5	Geschlechterunterschiede bei pathologischen kardialen Umbauprozessen .....	82
3.5.1	Geschlechterunterschiede in der kardialen Fibrose .....	83
3.5.2	Frauen und Männer mit Aortenstenose unterscheiden sich in der Expression Fibrose- und Inflammations- assoziierter Gene.....	83
3.6	Geschlechtsspezifische Regulation von Kollagen I und III durch 17 $\beta$ - Östradiol und Östrogenrezeptoren in kardialen Fibroblasten .....	85
3.6.1	Geschlechtsspezifische Aktivierung beider Östrogenrezeptoren in kardialen Fibroblasten durch 17 $\beta$ - Östradiol.....	85
3.6.2	Die 17 $\beta$ - Östradiol aktivierten Östrogenrezeptoren binden geschlechtsdimorph am Promoter von Kollagen I und III.....	86
3.6.3	Die geschlechtsspezifische Rolle der Östrogenrezeptoren bei der kardialen Fibrose .....	88
3.6.4	Geschlechtsspezifische Regulation von Kollagen I und III durch 17 $\beta$ - Östradiol in gewebeähnlichen 3D- Zellkulturen aus kardialen Fibroblasten.....	89
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	90
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	93
	Danksagung .....	106
	Eidesstattliche Erklärung .....	107

**Abkürzungsverzeichnis**

AGT	engl.: Angiotensinogen dt.: Angiotensinogen
AKT	engl.: Serin/threonin- specific kinase B dt.: Serin/Threonin Protein Kinase B
AMPK	engl.: AMP dependent protein kinase dt.: AMP- aktivierte Proteinkinase
AP-1	engl.: Activator protein- 1 dt.: Aktivator- Protein- 1
BERKO	Östrogenrezeptor beta knock- out
CaMK	engl.: Ca <sup>2+</sup> /calmodulin- dependent protein kinase dt.: Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin- abhängigen Proteinkinase
Cdk7	engl.: Cyclin- dependent kinase 7 dt.: Cyclin- abhängige Kinase 7
E2	17β-Östradiol
ELITE	engl.: Early Versus Late Intervention Trial with Estradiol
ERα/ERβ	Östrogenrezeptor alpha/beta
ERE	engl.: Estrogen responsive element dt.: Östrogen- Responsives Element
ERKO	Östrogenrezeptor alpha knock- out
GSK- 3β	engl.: Glycogen synthase kinase 3 beta dt.: Glykogen Synthase Kinase 3 beta
HERS I/II	engl.: Estrogen/Progestin Replacement Studies I and II
HFpEF	engl.: Heart failure with preserved ejection fraction
HFrfEF	engl.: Heart failure with reduced ejection fraction
HRT	engl.: Hormone replacement therapy dt.: Hormonersatztherapie- Studie

KEEG	engl.: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KEEPS	engl.: Kronos Early Estrogen Prevention Study
MAPK	engl.: Mitogen- activated protein kinases dt.: Mitogen- aktivierte Proteinkinase
MAPK- ERK1/2, - p38	engl.: Mitogen- activated protein kinases ERK1/2, - p38 dt.: Mitogen- aktivierte Proteinkinase ERK1/2, - p38
Mef2a	engl.: Myocyte- specific enhancer- factor 2A dt.: Myozyten- spezifischen Enhancer- Faktor 2A
miRNAs	engl.: microRNAs dt.: MikroRNAs
MMP- 2, - 9	engl.: Matrix metalloproteinases- 2, - 9 dt.: Matrix Metalloproteinase- 2, - 9
mRNA	engl.: messenger RNA dt.: Boten- RNA
NF- kB	engl.: Nuclear factor 'kappa- light- chain- enhancer' of activated B- cells
pg/ml	Piko-Gramm/Milliliter
NPPA	engl.: Naturetic peptide A dt.: Präkursor des atrialen naturetischen Peptids
NRF- 1, -2	engl.: Nuclear respiratory factor- 1, - 2 dt.: Nukleärer Respiratorischer Faktor- 1, - 2
PI3- K- AKT	engl.: Phosphoinositide 3- kinase- serin/threonin- specific kinase B dt.: Phosphoinositide 3- Kinase- Serin/Threonin Protein Kinase B
ROCK	Rho-Kinase
SNP	engl.: Single nucleotide polymorphism dt.: Single Nukleotid Polymorphismen

Sp1	engl.: Specifity protein 1
S6K	engl.: p70 s6 kinase dt.: p70 s6 Kinase
TGF- $\beta$ 1	engl.: Transforming growth factor beta 1 dt.: Transformierender Wachstumsfaktor beta 1
TIMP	engl.: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
WHO	engl.: World Health Organization dt.: Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
$\alpha$ -SMA	engl.: Alpha-smooth muscle actin dt.: glattmuskuläres Aktin

## 1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass sich Männer und Frauen zum einen funktionell in ihrer Physiologie als auch im Hinblick auf die Pathogenese verschiedener Erkrankungen signifikant unterscheiden. Daher reicht es nicht mehr aus die Pathophysiologie einer Erkrankung nur an einem Geschlecht zu untersuchen, zu verstehen und basierend darauf eine generelle Therapie für beide Geschlechter zu entwickeln. Aus diesem Grund haben sich weltweit verschiedenste Organisationen, wie das *National Institute of Health* und die Europäische Union, diesem Thema in den letzten Jahren angenommen und verfolgen die Implementierung des Faktors „Geschlecht“ sowohl in der klinischen Forschung als auch in der Grundlagenforschung intensiv. Dabei ist hervorzuheben, dass die Förderung des Einbezugs von Geschlechteraspekten in die Grundlagenforschung einen direkten Einfluss auf die Entwicklung von neuen Medikamenten sowie auf das Design und die Durchführung von klinischen Studien nehmen kann. Das angestrebte Ziel ist es, Männern und Frauen zukünftig eine besser angepasste Therapie von Krankheiten zukommen zu lassen.

### 1.1 Erkrankungen des Herz- Kreislauf- Systems

Wie die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO*) in ihrem ersten „Weltbericht über Altern und Gesundheit“ aus dem Jahre 2015 darlegte, steigt die Lebenserwartung der Menschen weltweit an [1]. Dennoch geht ein langes Leben oft mit erheblichen Beeinträchtigungen durch mehrere, gleichzeitig auftretende, Krankheiten einher. Die Gründe hierfür liegen insbesondere in der Abnahme der physiologischen Funktionen, dem Verlust der körpereigenen Regenerationsprozesse und der ansteigenden Anfälligkeit gegenüber verschiedenen chronischen Erkrankungen mit zunehmendem Alter [1]. Zu denen dabei am häufigsten auftretenden chronischen Erkrankungen gehören die des Herz- Kreislauf- Systems. In den westlichen Industrienationen zählen sie seit vielen Jahren zur Todesursache Nummer eins von Frauen und Männern. Im Jahr 2015 fielen in Deutschland 39 Prozent der Todesfälle auf Herz- Kreislauf- Erkrankungen zurück (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2017, [2]). Das heißt, 356.616 Menschen, darunter 157.996 betroffene Männer und 198.620 Frauen, verstarben infolge einer Erkrankung des Herzens.

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass kardiovaskuläre Erkrankungen Frauen und Männer auf unterschiedliche Weise betreffen können. Die wesentlichen Unterschiede liegen dabei in der Inzidenz, der Manifestation und Progression der Erkrankung sowie in der Prävalenz von Komorbiditäten und der Mortalität [3]. Generell kann beobachtet werden, dass Männer unter 50 Jahren eine stärkere Neigung zur Entwicklung von Erkrankungen des Herz- Kreislauf- Systems als Frauen im vergleichbaren Alter zeigen. Dagegen erkranken Frauen 7 - 10 Jahre später als Männer. Tritt die Herzerkrankung jedoch in früheren Jahren,

zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf, so ist die klinische Prognose für Frauen schlechter [4].

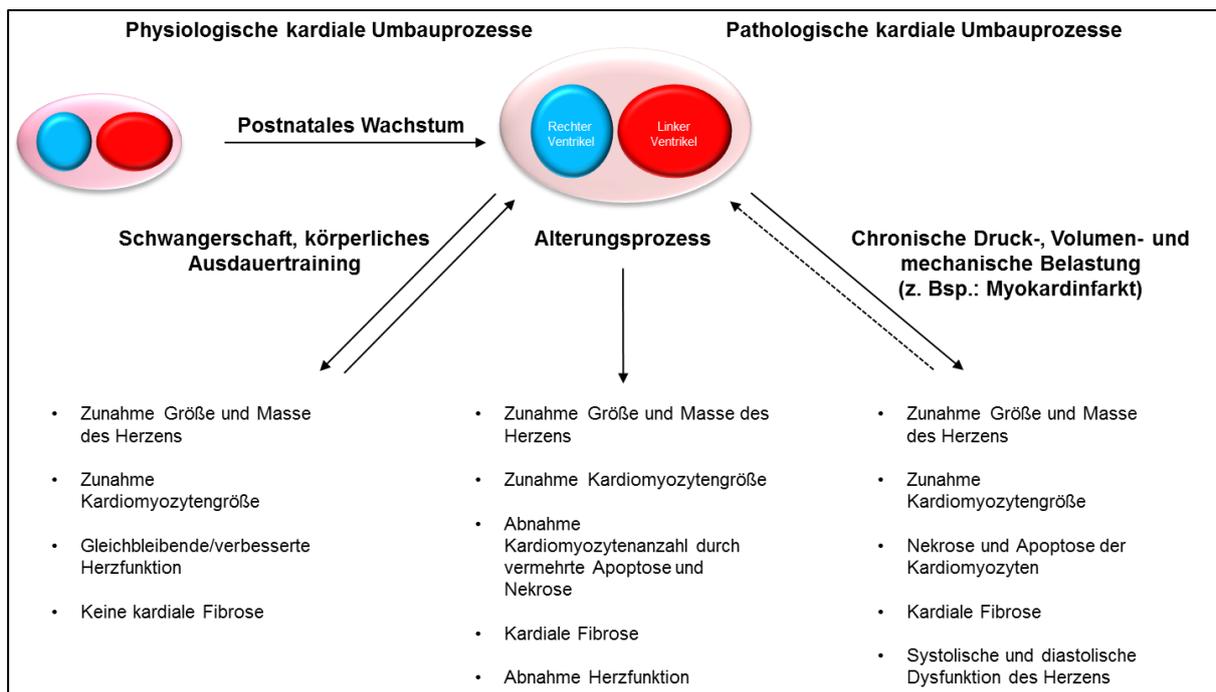
Zu den führenden Ursachen innerhalb der Gruppe der Herzerkrankungen, bei denen Unterschiede zwischen Männern und Frauen nachgewiesen werden können, zählen die chronische ischämische Herzerkrankung, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2017, [2]). So unterscheiden sich am Beispiel der chronischen ischämischen Herzerkrankung das zeitliche Auftreten und die Obstruktionsformen zwischen Patienten und Patientinnen. Bei Männern ist früher und häufiger eine obstruktive ischämische Herzerkrankung im Vergleich zu Frauen zu beobachten. Dies gilt als ursächlich dafür, dass Männer in jüngerem Alter öfter einen akuten Herzinfarkt als Frauen erleiden und daran versterben [4, 5]. Frauen dagegen zeigen häufiger eine nicht-obstruktive ischämische Herzerkrankung. Zudem weisen sie im Gegensatz zu Männern, die eher eine Einschränkung in den großen Koronararterien entwickeln, eine Funktionsstörung der mittleren und kleinen Koronarien auf [5, 6]. Die nicht-obstruktive Form ist schwerer als die obstruktive Form der ischämischen Herzerkrankung zu diagnostizieren und wird folglich verspätet therapiert, wodurch sich die klinische Prognose von Frauen gegenüber der von Männern signifikant verschlechtert [7]. Die Herzinsuffizienz betrifft Männer und Frauen in einer vergleichbaren Anzahl [2]. Signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen zeigen sich dabei in der Form der Funktionsstörung des Herzens. Frauen entwickeln überwiegend eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurfraction (*heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF), die sich als eingeschränkte diastolische Funktion des Herzens versteht, wogegen Männer eher eine Herzinsuffizienz mit einer eingeschränkten linksventrikulären systolischen Funktion (*heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF) aufweisen [8, 9]. Während die systolische Dysfunktion relativ gut untersucht ist und deren Behandlung durch die Leitlinien abgedeckt ist, ist die zugrundeliegende Pathophysiologie der diastolischen Dysfunktion nur unzureichend verstanden und behandelbar [10]. Jedoch ist zu beobachten, dass der klinische Verlauf der Erkrankung sowie die Mortalitätsrate bei Frauen besser als bei Männern ist [9, 11, 12].

## 1.2 Kardiale Umbauprozesse

Die Morphologie und Funktion des Herzens kann durch verschiedene Umbauprozesse verändert werden, welche einen Anpassungsmechanismus infolge einer dauerhaft erhöhten Belastung des Herzens darstellen [13]. Diese Umbauprozesse können ein physiologischer Prozess als Reaktion auf das postnatale Wachstum, Schwangerschaft oder körperliches Ausdauertraining sein (Abbildung 1) [14]. Dabei ist die physiologische Myokardhypertrophie durch eine Zunahme der Herzmuskelmasse und Vergrößerung der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) ohne Apoptose charakterisiert. Außerdem zeichnet sie sich durch eine

gleichbleibende oder verbesserte Herzfunktion, ohne Entwicklung einer kardialen Fibrose, aus und ist reversibel.

Zudem wurden mit dem Alterungsprozess verbundene Umbauprozesse des Herzens beschrieben (Abbildung 1). Dabei kommt es ebenfalls zu einer Vergrößerung des Herzmuskels und der Kardiomyozyten, aber auch zur Abnahme der Myozytenanzahl durch eine vermehrte Apoptose, Nekrose oder Autophagie [15]. Ferner ist die Ausbildung einer kardialen Fibrose und Abnahme der Herzfunktion zu beobachten [16]. Es ist umstritten, ob die altersassoziierten kardialen Umbauprozesse zu denen der physiologischen oder pathologischen Myokardhypertrophie gezählt werden können. Dennoch wird hier zwischen einem physiologischen Alterungsprozess des Herzens und Prozessen, die aufgrund zusätzlicher Komorbiditäten zu einer pathologischen Myokardhypertrophie führen unterschieden. Es ist aber unumstritten, dass die altersbedingten Umbauprozesse zu einem Verlust der endogenen kardialen Schutzmechanismen führen und daher mitverantwortlich für die erhöhte Anfälligkeit des alternden Herzens gegenüber verschiedenen Erkrankungen sind und je nach Art und Weise, auch die Manifestation und den Verlauf der Pathologie bestimmen können [15, 17, 18].



**Abbildung 1: Schematische Übersicht der kardialen Umbauprozesse während der physiologischen, Alters-assozierten und pathologischen Myokardhypertrophie.** Die Darstellung zeigt die wichtigsten Adaptionen des Herzens, die charakteristisch für die physiologische, Alters-assozierte und pathologische Myokardhypertrophie sind.

Die kardialen Umbauprozesse können aber auch eine pathologische Konsequenz sein: Hervorgerufen durch eine chronische Druckbelastung des Herzens, wie zum Beispiel bei der

arteriellen Hypertonie oder Aortenstenose sowie durch eine Volumenbelastung bei Aorteninsuffizienz, oder als Folge einer mechanischen Belastung im Rahmen eines Myokardinfarkt (Abbildung 1) [19]. Bei der pathologischen Myokardhypertrophie kommt es anfangs zu einer Steigerung der Herzfunktion, im weiteren Verlauf verschlechtert sich die Funktion jedoch bis hin zum Herzversagen und plötzlichen Tod des Patienten [20]. Dabei führt die Belastung des Herzens zunächst, vergleichbar zu der physiologischen Myokardhypertrophie, zu einer Zunahme der Herzmuskelmasse und Kardiomyozytengröße [21]. Später aber kommt es zur Apoptose oder Nekrose der Myozyten sowie zur Ausbildung einer kardialen Fibrose [21], welche die Progression der Herzerkrankung signifikant vorantreibt [22].

### 1.3 Die kardiale Fibrose

Das Auftreten von fibrotischen Prozessen stellt einen „*Point of no return*“ dar und treibt die Progression der Herzerkrankung bis hin zur Herzinsuffizienz wesentlich voran. Hauptsächlich ist die Fibrose durch den Umbau des kardialen Bindegewebes, der sogenannten extrazellulären Matrix, charakterisiert [22, 23]. Sie besteht überwiegend aus kollagenhaltigen Fasern, die sich primär aus dem Kollagen des Typs I und III sowie kleineren Mengen an Kollagen IV, V und VI zusammensetzen. Kollagen I besitzt durch seine dicken Fasern eine hohe Zugfestigkeit und trägt wesentlich zur Stabilität des Herzgewebes bei. Dagegen bildet Kollagen III ein lockeres Netzwerk aus dünnen Fasern und gewährleistet die Elastizität des Myokards [24]. Beide Kollagentypen beeinflussen somit die Spannung und Elastizität des Herzens während der Kontraktions- (Systole) und Entspannungsphase (Diastole). Weitere Komponenten der extrazellulären Matrix sind die Matrix Metalloproteinasen (*matrix metalloproteinases*, MMP). Hierbei handelt es sich um eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die als einzige Enzyme in der Lage sind, die durch eine außerordentlich hohe proteolytische Resistenz gekennzeichneten fibrillären Kollagene zu spalten [25]. Ihre Aktivität wird wiederum über die *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMP) kontrolliert und reguliert [26]. Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der Matrixkomponenten ist dabei für den Erhalt der extrazellulären Matrix von maßgeblicher Bedeutung. Kommt es zu einer länger anhaltenden Störung des Gleichgewichts, bedingt dies eine Veränderung der Form und Funktion des Myokards.

Die kardiale Fibrose tritt bei fast allen Formen der Herz- Kreislauf- Erkrankungen auf und zeichnet sich hauptsächlich durch eine gesteigerte Synthese und Ablagerung der Kollagene I und III aus [27]. Anfangs stellt sie einen reparativen Mechanismus dar, um den Verlust der Kardiomyozyten zu kompensieren. Dagegen führt eine andauernde Kollagensynthese und somit exzessive Ablagerung im Herzen zu einer Verdichtung und Verhärtung der Gewebestruktur, somit zur Reduktion der passiven Dehnbarkeit des Herzmuskels, und wird

als Ursache für die diastolische und systolische Funktionsstörung angesehen [28]. Des Weiteren kann die erhöhte Ablagerung der Kollagene zwischen den Kardiomyozyten zu einer Störung der elektrischen Erregung innerhalb der Systole, Beeinträchtigung des Zell-Zell-Kontaktes und Reduktion der Kapillardichte führen [29]. Letztere hat zur Folge, dass es zu einer Einschränkung der Sauerstoff-Diffusion im Herzen, gefolgt von einer Hypoxie der Kardiomyozyten, kommen kann. Der Grund für eine erhöhte Kollagenablagerung im Herzen ist aber nicht nur durch eine gesteigerte Synthese, sondern auch durch den ineffizienten Abbau der Kollagene durch die abnehmende Enzymaktivität der MMP, begründet [25].

Ein entscheidender Schritt bei der Entstehung der kardialen Fibrose ist die Aktivierung der Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten [30]. Dabei spielt die Zellaktivierung durch den Transformierenden Wachstumsfaktor beta 1 (*transforming growth factor beta 1*, TGF- $\beta$ 1) eine der bedeutendsten Rollen [31]. Dieser Faktor bewirkt eine Zunahme der Zellproliferation sowie eine erhöhte Synthese und Sezernierung der extrazellulären Matrixproteine. Insbesondere die Re-Expression des matrizellulären Proteins Periostin gilt heutzutage als potentieller Marker für aktivierte Myofibroblasten [30]. Zudem beeinflusst Periostin verschiedene zelluläre, wie Proliferation und Migration, und extrazelluläre Prozesse, inklusive der Prozessierung von strukturellen Matrixproteinen [32], und rückt daher mehr und mehr in den Fokus dominant an der Progression der kardialen Fibrose beteiligt zu sein. Zusätzlich exprimieren die Myofibroblasten glattmuskuläres Aktin ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA), wodurch sie in der Lage sind, ähnlich den glatten Muskelzellen, zu kontrahieren [30]. Kürzlich durchgeführte klinische und tierexperimentelle Studien konnten nachweisen, dass hauptsächlich die residenten, intra-kardialen Fibroblasten an den fibrotischen Prozessen im Herzen beteiligt sind [33-36]. Zusätzlich wird der Beitrag von Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die aus Endothelzellen [37] oder endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark [38] differenzieren, an der Entstehung der kardialen Fibrose diskutiert. Ihre genaue Rolle und wie groß ihr Anteil an den fibrotischen Prozessen im Herzen ist, wird derzeit aber noch aktiv beforscht.

#### **1.4 Kardiale Umbauprozesse sind geschlechtsspezifisch**

Unterschiede in den kardialen Umbauprozessen zwischen Männern und Frauen bei der trainingsinduzierten physiologischen [3, 39] und altersbedingten Myokardhypertrophie [40], sowie bei verschiedenen Herzerkrankungen [3, 41], konnten beobachtet werden. Diese beinhalten geschlechtsspezifische Anpassungen in der Morphologie und Funktion sowie strukturelle Veränderungen und molekularbiologische Mechanismen des Herzens. Die verantwortlichen geschlechtsdimorphen Mechanismen in der Physiologie und Pathologie des Herzens sind bis heute aber noch nicht im Detail verstanden und bedürfen weiterhin

intensiver Forschung. Die Identifikation und therapeutische Modifikation der für die Geschlechterunterschiede verantwortlichen Schlüsselregulatoren könnte dabei zu einem besseren Erhalt der Morphologie und Funktion des Herzens in beiden Geschlechtern beitragen.

#### **1.4.1 Geschlechterunterschiede bei physiologischen kardialen Umbauprozessen**

Untersuchungen im Menschen, die sich explizit mit Geschlechterunterschieden in der Entwicklung der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie beschäftigten, sind momentan unterrepräsentiert. Die wenigen durchgeführten Studien zeigen entweder eine geringere, vergleichbare oder größere Zunahme der Herzmuskelmasse in den Athletinnen gegenüber den Athleten [42-44]. Die Ergebnisse dieser Studien werden jedoch kontrovers diskutiert, da zum Beispiel der Hormonstatus der untersuchten Athleten und Athletinnen sowie die Trainingsdauer und -intensität nicht mit einbezogen wurden, oder nur schwer zum beobachteten Herzwachstum in Relation zu setzen sind. Deutlich ist aber, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Ausprägung einer trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie nimmt.

Im Gegensatz dazu bieten Tiermodelle eine gute Möglichkeit die Entwicklung der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie im direkten Geschlechtervergleich zu untersuchen und dabei die Trainingsbedingungen klar zu definieren und zu kontrollieren. Die Anzahl der bisher durchgeführten Studien, in denen weibliche und männliche Tiere im direkten Vergleich trainiert wurden, ist jedoch auch hier gering. Die bisher publizierten Ergebnisse zeigen aber eindeutig, dass es unabhängig vom freiwilligen oder erzwungenen Charakter des Trainings zu signifikanten Geschlechterunterschieden in der physiologischen Myokardhypertrophie kommt. In einem chronischen Schwimmmodell mit Ratten konnte in den weiblichen Tieren eine signifikant stärkere Zunahme der Herzmasse sowie eine verbesserte Kontraktilität gegenüber den trainierten männlichen Ratten beobachtet werden [45-47]. Im Gegensatz dazu kam es bei erzwungenem Training auf dem Laufband zu keiner Zunahme der Herzmasse bei beiden Geschlechtern [48]. Dafür wurde aber in den männlichen, jedoch nicht in den weiblichen Ratten eine signifikante Erhöhung der linksventrikulären Funktion gemessen. In diversen Mausmodellen, in welchen die Tiere entweder ein freiwilliges oder erzwungenes Training absolvierten, entwickelten die weiblichen Mäuse eine signifikant stärkere physiologische Myokardhypertrophie im Vergleich zu den männlichen Tieren [49-51]. Obwohl die weiblichen Mäuse im freiwilligen Laufradtraining eine längere Strecke als die männlichen Tiere rannten [49, 50], zeigte sich nach der Normalisierung der Zunahme der Herzmasse zur gelaufenen Strecke eine signifikant stärkere physiologische Myokardhypertrophie in den weiblichen Mäusen gegenüber den männlichen Tieren [50].

Ähnlich wie bei der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Studien zu Unterschieden in den kardialen Umbauprozessen zwischen Männern und Frauen mit zunehmendem Alter [40]. Dabei konnte bei Männern eine signifikant stärkere Zunahme der Kardiomyozytengröße sowie stärkere Abnahme der Myozytenanzahl im linken Herzventrikel, gegenüber gleichaltrigen Frauen, beobachtet werden [52]. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede konnten auf eine höhere Apoptose, Nekrose oder Autophagie der Myozyten im männlichen Herzen zurückgeführt werden [52]. In beiden Geschlechtern kommt es im Alter zu einer Zunahme der Masse und Wanddicke des linken Ventrikels sowie zur Abnahme der Herzfunktion [40]. Diesbezüglich wurden zwar für die Einschränkung der diastolischen Funktion des alternden Herzens [53] noch keine Geschlechterunterschiede beschrieben [40], dagegen zeigen jedoch ältere Männer gegenüber gleichaltrigen Frauen häufiger eine Einschränkung der systolischen Herzfunktion [54, 55]. Hinsichtlich der zu beobachtenden Entwicklung einer altersbedingten Fibrose, hervorgerufen durch die Zunahme des Kollagengehaltes im Herzen [56], wurden bisher noch keine Geschlechterunterschiede beschrieben [40].

#### **1.4.2 Geschlechterunterschiede bei pathologischen kardialen Umbauprozessen**

Zahlreiche klinische Studien zeigen signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede in der Form der pathologischen Myokardhypertrophie. Frauen entwickeln bei chronischer hämodynamischer Überlastung des Herzens, wie zum Beispiel bei Vorliegen einer Aortenstenose [57-62] oder arteriellen Hypertonie [63] eher eine konzentrische Form der pathologischen Myokardhypertrophie. Die Herzen sind dabei durch kleinere und dickwandigere linke Ventrikel, eine geringere Dilatation sowie bessere systolische Funktion gegenüber den männlichen Patienten charakterisiert. Im Gegensatz dazu zeigen Männer eher eine exzentrische Form der pathologischen Myokardhypertrophie. Diese zeichnet sich durch einen vergrößerten Durchmesser des linken Ventrikels, eine ausgeprägte Dilatation und eine eingeschränkte systolische Herzfunktion aus. Zudem sind Unterschiede bei Männern und Frauen in der Entwicklung der kardialen Fibrose bei verschiedenen Herz- Kreislauf- Erkrankungen zu beobachten. Dabei konnte in männlichen Patienten mit Aortenstenose [62, 64], hypertropher Kardiomyopathie [65], koronarer Herzerkrankung [66] und Atherosklerose [67] eine signifikant höhere Kollagenablagerung im Herzen, im Vergleich zu Frauen mit einem vergleichbaren Grad der Pathologie, nachgewiesen werden. Unsere Untersuchungen in Patienten mit Aortenstenose weisen darauf hin, dass männliche Herzen ebenfalls eine signifikant höhere Expression fibrotischer Gene, wie Kollagen I und III sowie dem MMP-2 und -9, im Vergleich zu den Herzen der Patientinnen aufweisen [58].

Mit Hilfe einer Vielzahl von Tiermodellen, die kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen nachahmen, konnten die beobachteten Unterschiede in der pathologischen

Myokardhypertrophie zwischen Männern und Frauen bestätigt werden [68, 69]. In Modellen zur chronischen Volumen- und Druckbelastung des Herzens sowie induziertem Myokardinfarkt konnte in männlichen Mäusen und Ratten eher die Entwicklung einer exzentrischen Myokardhypertrophie beobachtet werden. Die männlichen Tiere zeigten dabei eine signifikant stärkere Zunahme der Herzmuskelmasse [70-73], eine Dilatation des linken Ventrikels sowie eine schnellere Progression zur Herzinsuffizienz gegenüber den Weibchen [74-80]. Im Gegensatz dazu wiesen die Herzen weiblicher Mäuse und Ratten eine konzentrische Myokardhypertrophie, ohne Dilatation des linken Ventrikels und Entwicklung einer Herzinsuffizienz sowie eine besser erhaltene systolische Herzfunktion auf [80-82]. Ebenfalls konnten die in der Klinik beobachteten Geschlechterunterschiede in der Entwicklung der kardialen Fibrose in tierexperimentellen Untersuchungen mit Ratten und Mäusen bestätigt werden. Dabei wurde in der pathologischen Myokardhypertrophie nach induzierter Druck- [73, 75, 80, 83] oder Volumenbelastung des Herzens [71] sowie nach einem Myokardinfarkt [76] eine stärkere Kollagenablagerung und Induktion fibrotischer Gene in den Herzen der männlichen gegenüber den weiblichen Tieren beobachtet.

Die hier dargestellten klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass geschlechterabhängige Unterschiede sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen kardialen Umbauprozessen zu finden sind.

### **1.5 Rolle von 17 $\beta$ -Östradiol bei kardialen Umbauprozessen**

Der Grund für die in der Klinik und im Tiermodell beobachteten geschlechtsspezifischen kardialen Umbauprozesse kann durch mehrere Ursachen begründet sein. Einerseits können die Unterschiede genetisch, nämlich durch die Geschlechtschromosomen oder durch Geschlechtsdimorphismen in der Epigenetik manifestiert sein. Andererseits akkumulieren sich Hinweise aus klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen, dass das Sexualhormon 17 $\beta$ -Östradiol (E2) dabei eine wichtige regulatorische Rolle einnimmt [3, 69]. E2 gehört, neben Estron und Estriol, zur Familie der lipophilen Steroidhormone und stellt die biologisch aktivste Form der Östrogene dar [84]. E2 wird hauptsächlich im Ovar, in der Plazenta und zu einem geringen Teil auch in der Nebennierenrinde synthetisiert. Männer produzieren ebenfalls kleine Mengen an E2 im Hoden [85]. Zudem kann E2 lokal aus Testosteron im Fett- und neuronalem Gewebe, in der Brust, Knochen und im Herz durch das Enzym Aromatase in beiden Geschlechtern gebildet werden [86]. E2 spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Reproduktion, dem Zellwachstum, dem Fett- und Knochenstoffwechsel sowie im neuronalen und kardiovaskulären System [84]. Es beeinflusst aber auch viele pathologische Prozesse, wie die bei Erkrankungen des Herzens [84]. Mehrere Studien, welche die kardiale Expression des Aromatase- Gens (*Cyp19a1*) [87-89] sowie eine kardiale E2- Produktion nachwiesen

[89, 90], lassen vermuten, dass die lokale Synthese von E2 ebenfalls eine Rolle in der Physiologie und Pathologie des Herzens spielt.

### **1.5.1 Rolle von 17 $\beta$ -Östradiol bei physiologischen kardialen Umbauprozessen**

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass E2 im gesunden Herzen einen Einfluss auf die Herzgröße sowie kardiale Genexpression hat. In ovariectomierten Ratten wurde eine Zunahme der Herzmuskelmasse sowie deren Revidierung durch eine E2-Supplementation beschrieben [91]. Im Gegensatz dazu wiesen mehr Studien mit ovariectomierten Mäusen nach, dass die E2-Behandlung zu einer Vergrößerung der Herzmuskelmasse sowie der Kardiomyozyten führen kann [92, 93]. Des Weiteren konnte in alten ovariectomierten Ratten beobachtet werden, dass es durch das Defizit an E2 neben einer signifikanten Ablagerung von Kollagen I auch zu einer Abnahme von Kollagen III und der MMP2- Aktivität kam, wobei auch hier die Behandlung der Tiere mit E2 die Effekte wieder aufhob [94].

### **1.5.2 Rolle von 17 $\beta$ -Östradiol bei pathologischen kardialen Umbauprozessen**

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass Frauen vor der Menopause gegenüber gleichaltrigen Männern vor kardiovaskulären Erkrankungen geschützt sind. Nach dem Einsetzen der Menopause steigt das Auftreten von Herz- Kreislauf- Erkrankungen jedoch rasant an und ist vergleichbar mit der Anzahl der Erkrankungen von Männern im gleichen Alter [95-97]. Als mögliche Ursache wird angenommen, dass das Sexualhormon E2 in Frauen vor der Menopause eine protektive Wirkung auf das Herz- Kreislauf- System ausübt [98]. Mehrere Studien berichteten ebenfalls über eine modulatorische Rolle von E2 auf die Entstehung von Herz- Kreislauf- Erkrankungen bei Männern. So zeigten zum Beispiel Männer mit einem reduzierten E2- Plasmaspiegel oder mit einer E2- Resistenz, hervorgerufen durch eine Mutation im *CYP19A1* Gen, neben der Entwicklung einer Insulinresistenz, einen erhöhten Cholesterinspiegel, eine eingeschränkte Glukosetoleranz, die Entwicklung eines Diabetes Typ II sowie eine reduzierte Gefäßelastizität [99-101]. Diese Daten lassen vermuten, dass auch bei Männern die physiologische E2- Konzentration das Risiko, an einer Herz- Kreislauf- Erkrankung zu erkranken, senkt. Interessanterweise zeigte eine Untersuchung, dass bei Männern mit einer systolischen Herzinsuffizienz ein zu niedriger (<13 pg/ml) oder zu hoher E2- Gehalt (>37 pg/ml) im Serum mit einer erhöhten Mortalität gegenüber Männern mit normalen E2- Spiegel (22 - 30pg/ml) assoziiert ist [102]. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass E2 die Entwicklung und den Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen in beiden Geschlechtern beeinflusst.

Tierexperimentelle Untersuchungen bestätigten den modulierenden Effekt von E2 auf die pathologischen kardialen Umbauprozesse in beiden Geschlechtern. Ähnlich wie beim

Menschen, konnte in weiblichen Tieren eine protektive Rolle von E2 im erkrankten Herzen beobachtet werden. Ovariectomierte Mäuse [103-106] und Ratten [107] mit einer drucklast- bzw. volumenlastinduzierten Myokardhypertrophie zeigten durch die Substitution mit E2 eine geringere Zunahme der linksventrikulären Masse und der Kardiomyozytengröße, keine Veränderung der Kammergrößen, Schutz vor der Dilatation des Herzens und eine besser erhaltende Pumpfunktion im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren ohne E2-Gabe. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte am Tiermodell mit einem induzierten Myokardinfarkt oder Ischämie/Reperfusion beobachtet werden, dass ovariectomierte Mäuse und Ratten ein kleineres Infarktgebiet und weniger Kardiomyozytenapoptose durch die Behandlung mit E2 aufwiesen [108-114]. Untersuchungen männlicher Nagetiere wiesen ebenfalls auf eine schützende Rolle von E2 auf das Herz unter pathologischen Bedingungen hin. In männlichen Ratten mit einer volumenlastinduzierten Myokardhypertrophie führte die Applikation von E2 zu einer Abschwächung des kardialen pathologischen Umbaus und verbesserte die Herzpumpfunktion [115]. Zudem konnte in männlichen Mäusen mit einem induzierten Myokardinfarkt durch E2 eine verlangsamte Entwicklung der Herzinsuffizienz im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe ohne E2-Gabe nachgewiesen werden [116]. Im Gegensatz dazu existieren aber auch Studien, die nachwiesen, dass in ovariectomierten Mäusen mit einem induzierten Myokardinfarkt eine E2-Substitution die Zunahme der Herzmasse und die Mortalitätsrate steigerte [117] sowie die Dilatation und Abnahme der Pumpfunktion des Herzens unter pathologischen Umständen nicht verhindern konnte [106].

Dass E2 ebenfalls in den beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschieden der kardialen Fibrose eine regulatorische Rolle spielt, wurde durch mehrere Studien an weiblichen Mäusen und Ratten, mit druck- und volumenlastinduzierter Myokardhypertrophie sowie nach Myokardinfarkt, belegt. Hierbei wurde beobachtet, dass ein Defizit an E2 in ovariectomierten Tieren zur einer signifikant stärkeren Kollagenablagerung in den hypertrophierten Herzen gegenüber den intakten Kontrolltieren führte [104, 118-120]. Die Substitution mit E2 revidierte diesen Effekt und die Herzen der ovariectomierten Tiere wiesen eine vergleichbare Ausprägung der kardialen Fibrose wie die intakten Kontrolltiere auf.

Obwohl die Vielzahl der tierexperimentellen Studien einen protektiven Effekt von E2 auf die Pathogenese der Herzerkrankungen in beiden Geschlechtern zeigten und somit eine Gabe von E2 als pharmakologische Therapie implizieren, wird die Behandlung mit E2 und dessen protektive Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System im Menschen kontrovers diskutiert [121-123]. Ein Grund dafür sind die Vielzahl an Hormonersatztherapie-Studien (*hormone replacement therapies*, HRT), die widersprüchliche Daten hervorbrachten. Auf der einen Seite berichteten mehrere Beobachtungsstudien, wie zum Beispiel die *Nurse's Health Study*, dass die Anzahl der kardiovaskulären Erkrankungen und die damit verbundene Mortalitätsrate in Frauen, die nach Einsetzen der Menopause eine HRT erhielten, im

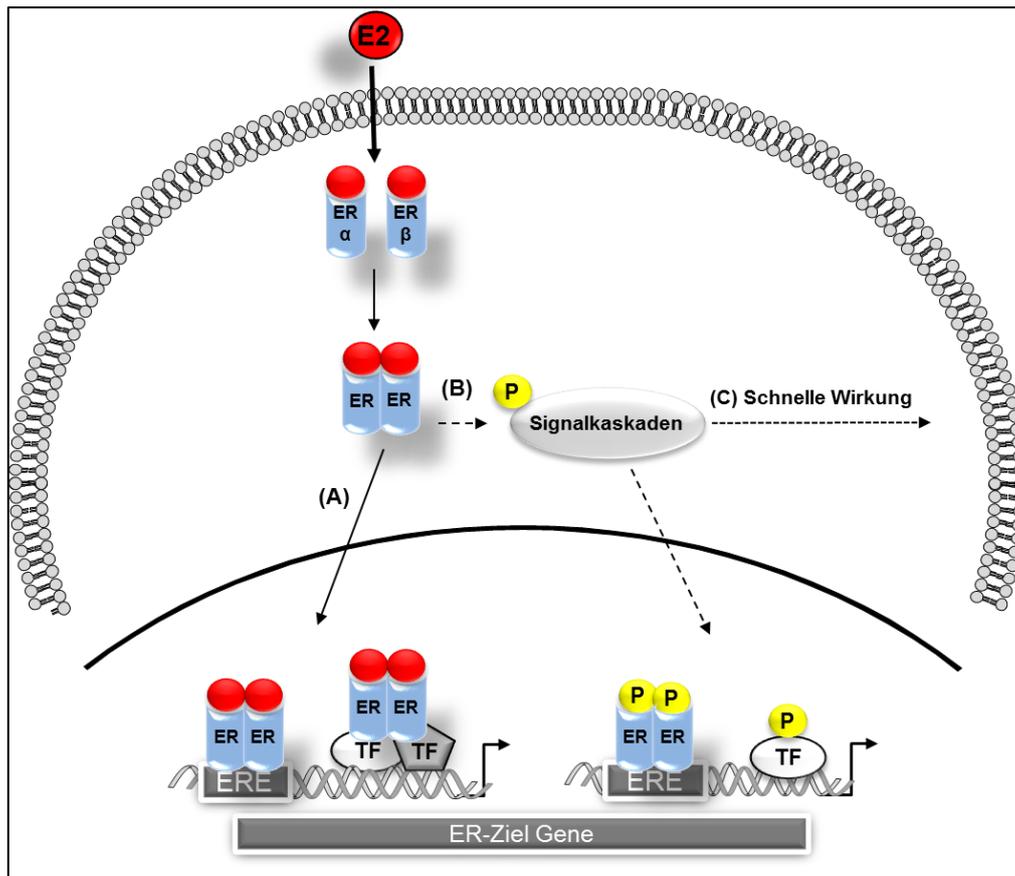
Vergleich zu gleichaltrigen Frauen ohne HRT signifikant geringer war [124-127]. Auf der anderen Seite zeigten die *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Studies I and II* (HERS I und II) ein erhöhtes Risiko für Thrombosen und Herz- Kreislauf- Erkrankungen, aber keinen Einfluss auf bestehende Herzerkrankungen nach Applikation von E2 und Progestinen [122]. Die *Women's Health Initiative* Studie musste sogar vorzeitig abgebrochen werden, da die Inzidenz für Erkrankungen wie Brustkrebs nach Applikation von E2 in Kombination mit Progestinen in den behandelten Frauen signifikant zunahm [123]. Unterschiede zwischen den Studien im Aufbau, den eingeschlossenen Frauen und deren Anzahl, die Form und Dosierung des verabreichten E2 sowie dessen Pharmakokinetik können dabei als ursächlich für die kontroversen Ergebnisse der Studien in Betracht gezogen werden [128-130]. Dass insbesondere der Zeitpunkt der Verabreichung der HRT eine Rolle spielt, konnte in zwei kürzlich durchgeführten Studien, der *Kronos Early Estrogen Prevention Study* (KEEPS) und der *Early Versus Late Intervention Trial with Estradiol* (ELITE) Studie, gezeigt werden. Hierbei war zu beobachten, dass bei Frauen, die mit der HRT in einem frühen Zeitraum nach Einsetzen der Menopause begannen, schützende Effekte auf Herz- Kreislauf- Erkrankungen zu erkennen waren. Dagegen wurde bei Frauen, die mit der HRT zu einem späteren Zeitraum der Menopause anfangen, keine protektive Wirkung mehr detektiert [131-133].

## 1.6 Rolle der Östrogenrezeptoren bei kardialen Umbauprozessen

Die im vorangegangenen Abschnitt dargelegten Erkenntnisse zeigen auf, wie komplex, widersprüchlich und weitgehend unverstanden die regulatorischen Wirkmechanismen von E2 auf das Herz- Kreislauf- System sind. Aus diesem Grund ist es essentiell die Effekte und molekularen Wirkmechanismen von E2 im Herzen detaillierter zu untersuchen und zu verstehen. E2 vermittelt seine Wirkung hauptsächlich durch die Bindung an die klassischen Rezeptoren Östrogenrezeptor alpha ( $ER\alpha$ ) und beta ( $ER\beta$ ), die zur Familie der Steroidhormonrezeptoren gehören [134].

Nach einer E2- vermittelten Aktivierung können beide ER über einen genomischen und nicht- genomischen Weg zelluläre Prozesse modulieren (Abbildung 2) [135]. Beim genomischen Weg agieren beide Rezeptoren als Liganden- induzierte Transkriptionsfaktoren (Abbildung 2A), wobei sie als Homo- oder Heterodimere an bestimmte DNA- Sequenzen binden und die Transkription zahlreicher Zielgene regulieren. Dabei können die ER einerseits durch die direkte Bindung an das Östrogen- Responsive Element (*estrogen responsive element*, ERE) oder andererseits durch die Interaktion mit anderen DNA- gebundenen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel dem Aktivator- Protein- 1 (*activator protein- 1*, AP- 1), Sp1 (*specificity protein 1*), NF-  $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa- light- chain- enhancer' of activated B- cells) und GATA, wirken. Zudem ist beschrieben, dass E2 an die zytoplasmatischen ER bindet, die daraufhin mit anderen Proteinen interagieren und

gemeinsam verschiedene zytosolische Signalkaskaden aktivieren können (Abbildung 2B). Dies kann wiederum zur Phosphorylierung der ER oder der bereits an der DNA- gebundenen Transkriptionsfaktoren führen und somit deren transkriptionelle Aktivität verändern [136-139]. Im Gegensatz zu dem genomischen kommt es bei dem nicht- genomischen Weg bereits innerhalb weniger Sekunden oder Minuten zu einer Wirkung der E2- aktivierten ER (Abbildung 2C). Hierbei bindet E2 an die zytosolischen bzw. Membran-assoziierten ER, wodurch andere membranständige Proteine und Signaltransduktionswege aktiviert werden und somit die schnelle Wirkung von E2 induziert wird [135].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Östrogenrezeptor vermittelten genomischen und nicht-genomischen Wirkung.** Genomische Wirkung der E2-aktivierten ER über A) direkte Bindung der Rezeptoren an das ERE oder durch die Interaktion der ER mit anderen, bereits an der DNA- gebundenen TF, wie zum Beispiel AP- 1, Sp1, NF- κB und GATA. B) Weiterhin ist die Bindung von E2 an die zytosolischen ER beschrieben, welche die Aktivierung verschiedener intra-zellulärer Signalkaskaden initiieren können. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung der ER oder anderer Transkriptionsfaktoren und somit zur Veränderung ihrer transkriptionellen Aktivität. C) Weiterhin ist die nicht-genomische Wirkung der E2-aktivierten ER beschrieben. Hierbei werden die zytosolischen ER durch E2 gebunden, wodurch verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden und die schnelle Wirkung von E2 induziert wird. E2: 17β-Östradiol, ERα/β: Östrogenrezeptor alpha/beta, ERE: Östrogen-Responsives-Element, TF: Transkriptionsfaktor, P: Phosphorylierung. Modifizierte Abbildung [140].

Da die Expression beider ER in den Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen des humanen Herzens [141, 142] sowie von Nagetieren beider Geschlechter nachgewiesen werden konnte [78, 89, 143-153], liegt es nahe anzunehmen, dass die beschriebene Wirkung von E2 im Herzen teilweise auf direkte ER-vermittelte Effekte in den kardialen Zellen zurückzuführen ist. Kararigas und Kollegen konnten hierbei in gesunden weiblichen Mäusen nachweisen, dass E2 über die Aktivierung des ER $\alpha$  die Zunahme der Herzgröße reguliert [93]. Unsere Untersuchungen in Mäusen mit einer Kardiomyozyten-spezifischen ER $\alpha$ -Überexpression untermauerten diese Ergebnisse und zeigten, dass die erhöhte Menge an ER $\alpha$ -Protein zu einer Zunahme der linksventrikulären Masse sowie Kardiomyozytenlänge führte [152]. Diese Daten deuten darauf hin, dass E2 seine regulatorische Rolle über die ER im gesunden Herzen vermittelt.

### **1.6.1 Rolle der Östrogenrezeptoren bei pathologischen kardialen Umbauprozessen**

Dass beide ER eine modulierende Wirkung auf die Morphologie des Herzens und Entwicklung von Herzerkrankungen in Frauen und Männern haben, konnte bereits durch mehrere Studien belegt werden. Eine durch Mutationen im Gen für ER $\alpha$  und ER $\beta$  hervorgerufene veränderte ER-Expression wurde mit einem erhöhten Gewicht sowie einer Zunahme der Wanddicke des Herzens in Zusammenhang gebracht [154, 155]. Ebenso wurde die reduzierte Expression von ER $\alpha$ , hervorgerufen durch Single Nukleotid Polymorphismen (*Single nucleotide polymorphism*, SNP) oder Methylierung des Gens, in Frauen und Männern mit einem erhöhten Auftreten koronarer und ischämischer Herzerkrankungen sowie mit einem gesteigerten Risiko gegenüber einem Myokardinfarkt assoziiert [156-161]. Auch für ER $\beta$  ist der Zusammenhang, zwischen einer veränderten Genexpression durch vorhandene SNP und einem erhöhten Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden, in beiden Geschlechtern beschrieben [162, 163]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von ER $\alpha$  und ER $\beta$  in den Herzen von Patientinnen und Patienten mit Aortenstenose, dilatativer Kardiomyopathie und koronarer Herzerkrankung gegenüber gesunden Probanden erhöht ist [141, 142, 164]. Zudem konnte ER $\alpha$  im gesunden Herzen in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten lokalisiert werden, wogegen im erkrankten Herzen der Patientinnen und Patienten mit Aortenstenose und dilatativer Kardiomyopathie dort kein ER $\alpha$  mehr zu detektieren war [141, 142]. Die krankheitsabhängige Regulation der Expression und Lokalisation beider ER im Herzgewebe zeigt, dass die ER bei Frauen und Männern im pathologischen Kontext einen modulierenden Einfluss nehmen können.

Um die modulierende Rolle beider ER bei kardiovaskulären Erkrankungen besser zu verstehen, wurde eine Vielzahl von Studien mit systemischen ER $\alpha$ - (ERKO) und ER $\beta$ - (BERKO) *knock-out* Mäusen durchgeführt und der Effekt spezifischer ER-Agonisten auf die Entstehung der pathologischen Myokardhypertrophie im Tiermodell näher analysiert

[140]. Hierfür wurden in verschiedenen Modellen zur druck- und volumenlastinduzierten Myokardhypertrophie und Myokardinfarkt, weibliche und männliche ERKO- und BERKO-Mäuse im direkten Vergleich zu Wildtyp (WT)- Mäusen untersucht. Zu beobachten war, dass weibliche ERKO- Mäuse eine zu den WT- Mäusen vergleichbare Zunahme der Herzmuskelmasse entwickeln [72]. Dagegen wiesen weibliche BERKO- Mäuse eine stärkere Größenzunahme des Herzens und Dilatation gegenüber den WT- Mäusen auf [71-73]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass dies mit einer ausgeprägteren Kardiomyozytenhypertrophie und Apoptose, im Vergleich zu den weiblichen WT- Mäusen, einherging [73]. Hinweise darauf, dass dabei der E2-aktivierte ER $\beta$  eine Rolle spielt, konnte in ovariectomierten WT-, ERKO- und BERKO- Mäusen nach Drucklast- oder Angiotensin II-induzierter Myokardhypertrophie erbracht werden. Im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren führte die Supplementation mit E2 nur in den WT- und ERKO- Mäusen, nicht aber in den BERKO- Mäusen, zu einer geringeren Zunahme der Herzmasse nach pathologischem Stimulus [105, 165]. Zudem kam es in männlichen BERKO- Maus Herzen ebenfalls zu einer stärkeren Hypertrophie der Kardiomyozyten und Apoptose sowie zu einer beschleunigten Entwicklung der Herzinsuffizienz gegenüber männlichen WT- Tieren. Demzufolge kann geschlussfolgert werden, dass im Mausmodell mit einer drucklastinduzierten pathologischen Myokardhypertrophie, ER $\beta$  in beiden Geschlechtern eine protektive Rolle einnimmt. Über eine schützende Rolle von ER $\beta$  nach einem Myokardinfarkt wurde ebenfalls berichtet: Bei weiblichen ovariectomierten ERKO- Mäusen konnte dabei ein signifikant kleinerer Infarktbereich im Vergleich zu BERKO- Mäusen beobachtet werden [166]. In einer anderen Studie zeigten weibliche BERKO- Mäuse zusätzlich eine erhöhte Mortalität und schnellere Entwicklung einer Herzinsuffizienz gegenüber weiblichen WT- Mäusen [167]. Eine weitere Studie untermauerte diese Ergebnisse und wies nach, dass der durch einen spezifischen Agonisten aktivierte ER $\beta$  in ovariectomierten WT- Mäusen zu einer besseren und schnelleren Heilung der Infarktregion nach Ischämie/Reperfusion gegenüber Tieren ohne Substitution führte [168]. Unsere Studie bestätigte diesen Befund und wies zusätzlich nach, dass es durch den spezifischen ER $\beta$ - Agonisten zu einer geringeren Nekrose und Apoptose der Kardiomyozyten sowie zu einem besseren Erhalt der Kontraktilität des Herzens in ovariectomierten Mäusen kam [114]. Weitere Studien berichteten ebenfalls über eine protektive Rolle von ER $\alpha$  bei kardialen Umbauprozessen in beiden Geschlechtern. Nach Ischämie/Reperfusion zeigten weibliche WT- Mäuse eine besser erhaltene Herzfunktion gegenüber den Männchen sowie männlichen und weiblichen ERKO- Mäusen [169]. Ovariectomierte Ratten zeigten, dass die Behandlung mit einem spezifischen ER $\alpha$ - Agonisten zu einer Verkleinerung des Infarktgebietes [170, 171] und in männlichen Mäusen die Abwesenheit von ER $\alpha$  in zu einer verschlechterten Herzfunktion, dem Auftreten von Arrhythmien und myokardialen Nekrose nach Ischämie/Reperfusion führte [172].

Weitere Studien untersuchten die Rolle von ER $\alpha$  und ER $\beta$  bei der E2- vermittelten Inhibition der Fibroseentstehung genauer. In ovariectomierten Mäusen und Ratten führte die Gabe eines spezifischen ER $\alpha$ - Agonisten zur Reduktion der kardialen Fibrose gegenüber den unbehandelten Weibchen nach drucklastinduzierter Myokardhypertrophie und Myokardinfarkt [104, 118]. Außerdem zeigten weibliche BERKO- Mäuse eine signifikant stärkere Fibrose gegenüber weiblichen WT- Mäusen nach induzierter Volumen- oder Drucklast sowie Angiotensin II- und Endothelin- Behandlung [71, 153, 173]. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass die Deletion von ER $\beta$  in männlichen Mäusen in einer geringeren kardialen Fibrose gegenüber den männlichen WT- Tieren resultierte [73]. Diese Ergebnisse führten uns zu der Annahme, dass im Gegensatz zum weiblichen Herzen, ER $\beta$  im männlichen Herzen die Entwicklung der Fibrose sogar fördert.

Zusammenfassend belegt die derzeitige Datenlage, dass beide ER eine Rolle in der Pathologie des Herzens im männlichen und weiblichen Geschlecht spielen. Bisher konnte aber nicht eindeutig geklärt werden, ob ER $\alpha$  oder ER $\beta$  die schützende Rolle im geschädigten Herz einnimmt. Es scheint eher so, dass die regulatorische Rolle von ER $\alpha$  und ER $\beta$  abhängig von der jeweiligen Pathologie sowie vom Geschlecht ist. Erschwerend kommt hinzu, dass die Expression und Lokalisation der ER sowie deren vermittelte Genregulation zellspezifisch ist. Zudem ist beschrieben, dass ER $\alpha$  und ER $\beta$  die gleichen Gene unterschiedlich regulieren können. Hierbei stellt sich die Komplexität der E2- ER vermittelten Regulation dar und zeigt auf, dass ein tieferes und detaillierteres Verständnis der E2 und ER- vermittelten Mechanismen im Herzen notwendig ist.

### **1.6.2 Effekte von Östrogen und Östrogenrezeptoren in kardialen Fibroblasten**

Um die E2- und ER- vermittelten Effekte auf die Entwicklung der kardialen Fibrose in beiden Geschlechtern detaillierter zu verstehen und zukünftig therapeutisch präzise zu modulieren, ist es notwendig den verantwortlichen Zelltyp zu identifizieren und die involvierten molekularen Regulationsmechanismen zu analysieren. Bisher zeigten *in-vitro* Untersuchungen in kardialen Fibroblasten, dass E2 eine inhibierende Wirkung auf die Kollagenbiosynthese hat [174, 175]. Unsere Arbeiten mit isolierten kardialen Fibroblasten von Ratten wiesen in beiden Geschlechtern eine Inhibition der MMP- 2 Genexpression durch den E2- aktivierten ER $\alpha$  nach [176]. Der zugrundeliegende Signalmechanismus beinhaltet eine Aktivierung des ER $\alpha$  und der Mitogen- aktivierten Proteinkinase ERK1/2 (*mitogen- activated protein kinase ERK1/2*, MAPK- ERK1/2). Zudem konnten wir erstmals beschreiben, dass die Expression von Kollagen I und III unterschiedlich in weiblichen und männlichen kardialen Fibroblasten durch E2 reguliert wird [58]. Hierbei wurde eine inhibierende Wirkung von E2 auf beide Kollagentypen in den Zellen weiblicher Ratten detektiert, wogegen eine Induktion von Kollagen I und III in den männlichen Zellen durch E2

beobachtet wurde. Die Ergebnisse einer weiteren von uns durchgeführten Studie zeigten, dass die Expression Fibrose-assoziiierter MikroRNAs (*microRNAs*, miRNAs), wie miR- 24, miR- 27a, miR- 27b, miR- 106a und miR- 106b, durch den spezifischen ER $\beta$ - Agonisten ebenfalls geschlechtsspezifisch in kardialen Rattenfibroblasten reguliert werden [177].

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine geschlechtsspezifische Aktivierung der ER ein möglicher Mechanismus für die geschlechtsspezifische E2- und ER-vermittelte Regulation fibrotischer Gene sein könnte. Detaillierte Analysen dieses potentiellen Mechanismus könnten dazu beitragen, therapeutische Ziele für beide Geschlechter zu identifizieren und pharmakologisch zu modulieren.

## 1.7 Zielstellung

Über die Unterschiede in den kardialen Umbauprozessen zwischen Männern und Frauen wurde bisher in mehreren Studien berichtet und sie finden zunehmende Akzeptanz. Verschiedene Untersuchungen weisen auf die regulatorische Rolle von E2 sowie des ER $\alpha$  und ER $\beta$  in diesen Prozessen bei beiden Geschlechtern hin. Obwohl dabei eine protektive Wirkung der E2- und den ER- vermittelten Effekten nachgewiesen werden konnte, ist die therapeutische Anwendung bei Herzerkrankungen aufgrund der noch unverständenen Mechanismen umstritten. Daher bilden die weitere Identifikation und detaillierte Analyse der E2- und ER- vermittelten Mechanismen, welche für die geschlechtsdimorphen Umbauprozesse des Herzens verantwortlich sind, die Grundlage für die Gewährleistung einer optimaleren Therapie für Mann und Frau.

Daher standen im Mittelpunkt der hier zusammengefassten Forschungsarbeiten:

- 1) Molekularbiologische Unterschiede, die eine Rolle in den geschlechtsspezifischen kardialen Umbauprozessen spielen, zu identifizieren.
- 2) ER- vermittelte Signalmechanismen innerhalb der kardialen Umbauprozesse, die zur geschlechtsspezifischen Ausprägung der Herzadaption beitragen, zu identifizieren und näher zu charakterisieren.
- 3) E2- und ER- vermittelte Regulationsmechanismen im Rahmen kardialer Umbauprozesse in beiden Geschlechtern detailliert zu analysieren.

## 2 Eigene Arbeiten

### 2.1 Geschlechterunterschiede in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie sind durch den Östrogenrezeptor beta moduliert

*Sex differences in exercise- induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta*

Eine Reihe von Studien belegt die Existenz von Geschlechterunterschieden in der Entwicklung der pathologischen Myokardhypertrophie im Menschen sowie in Tiermodellen für kardiovaskuläre Erkrankungen [3, 68, 69]. Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [72, 105, 153] und unsere Ergebnisse am Mausmodell zeigten, dass ER $\alpha$  und ER $\beta$  dabei eine Rolle spielen [73, 78, 104, 152]. Bisher durchgeführte Studien zur trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie im Tiermodell konnten nachweisen, dass auch in diesem Fall Geschlechterunterschiede existieren [49-51]. Unbekannt war dagegen, ob und welche Rolle die ER dabei spielen.

Demzufolge untersuchten wir in dieser Arbeit die Bedeutung beider ER in der Ausprägung von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der physiologischen Myokardhypertrophie und setzten uns die Identifikation möglicher dafür verantwortlicher Mechanismen zum Ziel. Zur Induktion der physiologischen Myokardhypertrophie absolvierten die weiblichen und männlichen WT- Mäuse ein freiwilliges, ein- oder achtwöchiges Laufradtraining. Um die Rolle der ER aufzuklären, wurden ERKO- und BERKO- Mäuse beider Geschlechter ebenfalls einem Laufradtraining ausgesetzt. In Übereinstimmung mit anderen Studien liefen die weiblichen WT- Mäuse innerhalb von 24h eine signifikant längere Laufstrecke gegenüber den männlichen Mäusen. Nach achtwöchigem Training wurde in beiden Geschlechtern eine signifikante Zunahme der linksventrikulären Herzmuskelmasse beobachtet, welche stärker in den weiblichen als in den männlichen Mäusen ausgeprägt war. Die weiblichen ERKO- Mäuse liefen nicht freiwillig in ihrem Laufrad. Dagegen zeigten die männlichen ERKO- Mäuse eine vergleichbare Laufaktivität und Zunahme der linksventrikulären Herzmuskelmasse gegenüber den männlichen WT- Mäusen. Die männlichen und weiblichen BERKO-Mäuse absolvierten im Vergleich zu den WT- Mäusen eine gleich lange Laufstrecke innerhalb von 24h, jedoch führte die Laufaktivität zu keiner Zunahme der Herzmuskelmasse in beiden Geschlechtern. In den Analysen bezüglich der involvierten molekularen Mechanismen konnten wir eine Erhöhung der Aktivitäten der Serin/Threonin Protein Kinase B (*serin/threonin- specific kinase B*, AKT), der MAPK- ERK1/2, der Mitogen- aktivierten Proteinkinase p38 (*mitogen- activated protein kinase p38*, MAPK- p38) und der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins in den weiblichen, aber nicht in den männlichen WT- Mäusen nach dem Training nachweisen. Des Weiteren war nur in den weiblichen, aber nicht in den männlichen WT- Mäusen eine Zunahme des

Expressionsniveaus verschiedener Schlüsselregulatoren der mitochondrialen Funktion sowie den Proteinen der mitochondrialen Atmungskette durch das Training zu messen. Zudem wiesen nur die weiblichen WT- Mäuse eine Abnahme der großen Mitochondrien hin zu kleineren Mitochondrien auf. Die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede in den WT- Mäusen wurden durch die Deletion von ER $\beta$  aufgehoben.

Basierend auf den Ergebnissen konnten wir schlussfolgern, dass die Ausprägung von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie durch ER $\beta$  vermittelt wird. Eine stärkere Zunahme der Myokardmasse in den weiblichen gegenüber den männlichen Mäusen ist auf die ER $\beta$ - vermittelte Aktivierung des AKT- und MAPK- Signalweges, Erhöhung der Proteinsynthese sowie der mitochondrialen Adaption zurückzuführen.

**Dworatzek E\***, Mahmoodzadeh S\*, Schubert C, Westphal C, Leber J, Kusch A, Kararigas G, Fliegner D, Moulin M, Ventura-Clapier R, Gustafsson JA, Davidson MM, Dragun D, Regitz-Zagrosek V. Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta. *Cardiovasc Res.* 2014;102(3):418-28.

\*geteilte Autorschaft

<https://doi.org/10.1093/cvr/cvu065>

## 2.2 Maladaptive Umbauprozesse in Herzen von Frauen mit Aortenstenose sind mit einer erhöhten Sterberate nach Aortenklappenersatz assoziiert

*Maladaptive remodeling is associated with impaired survival in women but not in men after aortic valve replacement*

Klinische Studien berichteten bei Patienten mit Aortenstenose über signifikante Unterschiede in der Form der pathologischen Myokardhypertrophie zwischen Männern und Frauen [60, 62, 75]. In einer von uns durchgeführten Studie zeigten wir, dass bei vergleichbarem Grad der Erkrankung, Frauen überwiegend eine adaptive Form der Myokardhypertrophie entwickeln [58]. Dagegen weisen die Herzen der Männer häufiger eine maladaptive Myokardhypertrophie und stärkere Aktivierung fibrotischer Gene, wie Kollagen I, III, MMP- 2 und -9 gegenüber Patientinnen auf. Interessanterweise zeigten die Frauen mit Aortenstenose, im Gegensatz zu Männern, nach Entlastung des Herzens mittels eines operativen Aortenklappenersatzes bereits nach einer Woche eine signifikante post- operative Reversibilität der Myokardhypertrophie. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede bei den kardialen Umbauprozessen sowohl unter Belastung, als auch bei Entlastung des Herzens gibt, bei denen die Fibrose möglicherweise eine wichtige Rolle spielt.

In dieser weiterführenden Studie erhoben wir klinisch relevante Parameter um den Verlauf der post- operativen Reversibilität der Myokardhypertrophie in Männer und Frauen mit Aortenstenose nach Aortenklappenersatz über einen längeren Zeitraum näher zu analysieren. Des Weiteren wurde das Überleben der Patientinnen und Patienten nach der Operation genauer betrachtet. Der Fokus lag hierbei auf der Analyse, ob die Geschlechterunterschiede in der Form der pathologischen Myokardhypertrophie in einen Zusammenhang mit dem post- operativen Überleben von Frauen und Männern mit Aortenstenose gebracht werden können. Um zu untersuchen, ob die geschlechtsspezifische Expression fibrotischer Gene mit Geschlechterunterschieden in der kardialen Fibrose assoziiert ist, wurde in intra- operativ entnommenen linksventrikulären Biopsien das Maß der Kollagenablagerung sowie Fibrose-assozierte Signalmechanismen und Schlüsselregulatoren analysiert. In 128 Patienten mit Aortenstenose, darunter 63 Frauen ( $71 \pm 9$  Jahre) und 65 Männer ( $70 \pm 10$  Jahre), konnten wir mittels Echokardiographie zeigen, dass 62 % der Frauen und 45 % der Männer eine adaptive Form der Myokardhypertrophie aufwiesen ( $p < 0,05$ ).  $4 \pm 1,6$  Jahre nach Aortenklappenersatz konnte bei 75 % der Frauen und in 49 % der Männer eine adaptive Myokardhypertrophie beobachtet werden ( $p < 0,031$ ). Die histologische Untersuchung der intra- operativ entnommenen Biopsien zeigte, dass Männer mit Aortenstenose zum Zeitpunkt der Operation eine signifikant höhere Kollagenablagerung gegenüber den männlichen gesunden Kontrollen und im Vergleich zu

den Patientinnen aufwies ( $p < 0,05$ ). Diese war mit einer Induktion des fibrotischen Schlüsselproteins TGF- $\beta$ 1, der Phosphorylierung des durch TGF- $\beta$ 1 aktivierten Smad2 sowie einem erhöhten Periostin Proteinniveau in den Herzen der männlichen Patienten gegenüber den gesunden Männern assoziiert. Bei der Betrachtung der post-operativen Überlebensrate ergab sich, dass Frauen mit einer adaptiven Form der Myokardhypertrophie eine signifikant bessere Überlebensrate gegenüber Frauen mit maladaptiver Myokardhypertrophie hatten. Im Gegensatz dazu hatte die Form der pathologischen Myokardhypertrophie in Männern keinen Einfluss auf das Überleben nach Operation.

Daraus ergibt sich als Schlussfolgerung, dass Frauen mit Aortenstenose überwiegend eine adaptive Form der Myokardhypertrophie zeigen. Dagegen weisen die Herzen der Männer eher eine maladaptive Form der pathologischen Myokardhypertrophie und mehr Fibrose als Patientinnen auf. Zudem konnten wir nach Aortenklappenersatz eine Reversibilität der Myokardhypertrophie in den Frauen, aber nicht in den Männern mit Aortenstenose beobachten. Diese Daten belegen, dass Patientinnen nicht nur in der frühen post-operativen Phase, sondern auch vermehrt über einen längeren Zeitraum nach dem Eingriff bezüglich der Reversibilität gegenüber erkrankten Männern profitieren. Der Befund, dass bei Frauen eine maladaptive Myokardhypertrophie signifikant mit einer schlechteren post-operativen Überlebensrate assoziiert ist, verdeutlicht, dass das Geschlecht als modulierender Faktor mit in die Behandlungsstrategien von Patienten und Patientinnen mit Aortenstenose einbezogen werden muss.

Petrov G\*, **Dworatzek E\***, Schulze TM\*, Dandel M, Kararigas G, Mahmoodzadeh S, Knosalla C, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Maladaptive remodeling is associated with impaired survival in women but not in men after aortic valve replacement. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7(11):1073-80.

\*geteilte Autorschaft

<https://doi.org/10.1016/j.icmg.2014.06.017>

### **2.3 Geschlechtsspezifische Regulation Fibrose- und Inflammations-assoziierter Gene im humanen linken Ventrikel von Patienten und Patientinnen mit Aortenstenose**

*Sex- dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload.*

In unseren Studien mit Patienten mit Aortenstenose konnten wir Geschlechterunterschiede in der Form der pathologischen Myokardhypertrophie nachweisen [58, 178]. Diese Unterschiede führen nicht nur zu einem Geschlechtsdimorphismus in der Funktion des Herzens und dem Voranschreiten der Pathologie, sondern spielen ebenfalls eine Rolle im post-operativen Verlauf, wie zum Beispiel bei der Reversibilität der Myokardhypertrophie und Mortalität nach Aortenklappenersatz bei Männern und Frauen [58, 178].

Ziel dieser Studie war es, verantwortliche molekularbiologische Mechanismen für die Geschlechterunterschiede in den kardialen Umbauprozessen zu identifizieren. In 104 Patienten mit Aortenstenose, davon 56 Frauen (70 ± 9 Jahre) und 48 Männern (69 ± 10 Jahre), konnten wir mittels Echokardiographie zeigen, dass 65 % der Männer und 33 % der Frauen eine maladaptive Form der Myokardhypertrophie aufwiesen ( $p < 0,01$ ). Mit Hilfe einer Chip-basierten Genexpressionsanalyse wurden intra-operativ entnommene linksventrikuläre Biopsien einer repräsentativen Subpopulation von 19 Patienten (53 % Frauen) im Vergleich zu Herzgeweben von 18 gesunden Spendern untersucht. Die Transkriptomanalysen ergaben eine Regulation von 2873 Genen in Männern und von 3491 Genen in Frauen mit Aortenstenose gegenüber ihren gesunden Kontrollen. Die Schnittmenge zwischen Männern und Frauen bestand in 1382 Genen, die in beiden Geschlechtern vergleichbar reguliert waren. Die übrigen Gene zeigten eine geschlechtsdimorphe Regulation. Eine Subanalyse belegte, dass insbesondere Fibrose- assoziierte Gene und Signalwege nur in den Herzen der männlichen Patienten induziert waren. Dagegen konnte eine Inhibierung von inflammatorischen Genen und assoziierten Signalwegen nur in weiblichen Herzen mit Aortenstenose beobachtet werden. Die geschlechtsspezifische Regulation einzelner Fibrose- und Inflammations- assoziierter Gene in den Herzen der Patienten mit Aortenstenose konnten wir auf Gen- und Proteinebene bestätigen, sowie eine stärker ausgeprägte Fibrose in den Männern gegenüber den Frauen nachweisen.

Unsere Studie zeigt, dass sich verschiedene molekulare Mechanismen während des kardialen Umbauprozesses bei drucklastinduzierter Myokardhypertrophie zwischen Frauen und Männern unterscheiden lassen. Die maladaptive Form der pathologischen Myokardhypertrophie, die häufiger bei Männern als bei Frauen zu beobachten ist, ist dabei durch eine Induktion inflammatorischer und Fibrose- assoziierter Gene sowie

pro-fibrotischer Signalwege in den männlichen Herzen charakterisiert. Schlussfolgernd nehmen wir an, dass die geschlechtsspezifische Regulation der kardialen Umbauprozesse zu den in der Klinik beobachteten Geschlechterunterschieden in der Entwicklung der Herzinsuffizienz beiträgt.

Kararigas G, **Dworatzek E**, Petrov G, Summer H, Schulze TM, Baczko I, Knosalla C, Golz S, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload. *Eur J Heart Fail.* 2014;16(11):1160-7.

<https://doi.org/10.1002/ejhf.171>

## 2.4 Effekt des Alterns auf die kardiale extrazelluläre Matrix in Männern und Frauen

### *Effects of aging on cardiac extracellular matrix in men and women*

Unsere Untersuchungen mit Patienten mit Aortenstenose zeigten, dass signifikante Geschlechterunterschiede in der kardialen Fibrose basierend auf einer geschlechtsdimorphen Regulation extrazellulärer Matrixkomponenten existieren [58, 178, 179]. Zudem ist beschrieben, dass es mit zunehmendem Alter zur Entwicklung einer Fibrose im Herzen kommt [180]. Bis dato war aber nicht im Detail geklärt, welchen Effekt das Altern auf einzelne Komponenten der extrazellulären Matrix in gesunden Individuen hat, und ob diese Effekte möglicherweise geschlechtsspezifisch sind.

Vor diesem Hintergrund charakterisierten wir die Auswirkungen des Alterns auf die Proteinmenge verschiedener extrazellulärer Matrixkomponenten in Herzbiopsien gesunder Frauen und Männer. Wir untersuchten hierfür zwei verschiedene Altersgruppen: junge Probanden (17 - 40 Jahre, n = 7 Männer, n = 7 Frauen) im Vergleich zu älteren Probanden (50 - 68 Jahre, n = 9 Männer, n = 8 Frauen). Der Vergleich der beiden Altersstufen zeigte eine signifikante altersabhängige geschlechtsspezifische Regulation der Proteine Kollagen I, III und VI, von TIMP 3 sowie Smad2 und Smad3. Generell konnten wir in der jungen Altersgruppe beobachten, dass die Menge der extrazellulären Matrixproteine geringer in Frauen als in Männern war. Dagegen zeigte sich in der Gruppe der älteren Probanden, dass die Herzen der Frauen eine größere Menge dieser Proteine im Vergleich zu den Männern aufweisen. Somit konnten wir erstmals nachweisen, dass Geschlechterunterschiede in der altersbedingten Regulation der extrazellulären Matrix im humanen Herzen bestehen. Die Veränderungen der extrazellulären Matrix mit zunehmendem Alter könnten dabei eine limitierende Rolle im alternden Herzen darstellen, um auf eine zunehmende Arbeitslast und Gewebeverletzungen ausreichend kompensatorisch zu reagieren.

**Dworatzek E**, Baczko I, Kararigas G. Effects of aging on cardiac extracellular matrix in men and women. *Proteomics Clin Appl.* 2016;10(1):84-91.

<https://doi.org/10.1002/prca.201500031>

## 2.5 Die geschlechtsspezifische Regulation der Expression von Kollagen I und III durch 17 $\beta$ -Östradiol in kardialen Fibroblasten: Rolle der Östrogenrezeptoren

*Sex- specific regulation of collagen I and III expression by 17 $\beta$ - Estradiol in cardiac fibroblasts: role of estrogen receptors*

In unseren vorangegangenen Untersuchungen war es uns möglich, Geschlechterunterschiede in der Entwicklung der kardialen Fibrose im Menschen und in Tiermodellen für kardiovaskuläre Erkrankungen aufzuzeigen [58, 73, 178, 179]. Dabei wiesen Männer und männliche Mäuse eine stärkere Aktivierung fibrotischer Gene, fibrotischer Schlüsselproteine und mehr Kollagenablagerung im Herzen gegenüber den Patientinnen und weiblichen Mäusen auf. Verschiedene Studien mit ovariectomierten Tieren konnte den hemmenden Effekt von E2 auf die Entstehung der Fibrose nachweisen [104, 118, 120, 153]. Zudem konnten wir in unseren vorangegangenen *in-vitro* Analysen mit isolierten Fibroblasten aus Rattenherzen nach der E2- Behandlung weiblicher Zellen eine signifikante Unterdrückung der Kollagen I und III mRNA beobachten [58]. Dagegen kam es in den männlichen Zellen durch die Inkubation mit E2 zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA beider Kollagene.

Diese Daten führten uns zu der Annahme, dass die E2- vermittelte geschlechtsspezifische Kollagen I und III Regulation in den kardialen Fibroblasten für die in der Klinik beobachteten Geschlechterunterschiede in der kardialen Fibrose verantwortlich sein könnte. Mit diesem Hintergrund untersuchten wir die Rolle von E2 und den ER in der geschlechtsdimorphen Regulation von Kollagen I und III in isolierten kardialen Fibroblasten von Menschen und Nagern sowie *in-vivo* detaillierter. Zunächst konnten wir nachweisen, dass die E2- vermittelte geschlechtsspezifische Regulation der Kollagen I und III mRNA ebenfalls in humanen kardialen Fibroblasten zu beobachten ist, welches auf einen konservierten Mechanismus zwischen den Spezies schließen lässt. Weiterhin bestätigten wir die E2- vermittelte geschlechtsdimorphe Regulation beider Kollagene auf Proteinebene in kardialen Fibroblasten von Ratten. Untersuchungen mit spezifischen ER $\alpha$ - und ER $\beta$ - Agonisten legten nahe, dass in weiblichen Zellen ER $\alpha$  für die Reduktion und ER $\beta$  in männlichen Zellen für die Induktion der Kollagen I und III Expression verantwortlich ist. Zudem induzierte E2 nur in weiblichen Zellen eine Phosphorylierung des ER $\alpha$  am Serin 118. Im Gegensatz dazu wurde ER $\beta$  am Serin 105 durch E2 nur in den männlichen Zellen phosphoryliert. Die geschlechtsspezifische Aktivierung der Rezeptoren führte zu einer geschlechtsdimorphen Bindung beider ER an die Promotoren von Kollagen I und III. Dabei konnte in den weiblichen kardialen Fibroblasten eine Bindung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  nachgewiesen werden, wogegen in den männlichen Zellen nur eine ER $\beta$ -Bindung an die Kollagenpromotoren detektierbar war. Weiterführende Untersuchungen in 3D- Zellkulturen aus weiblichen und männlichen

kardialen Fibroblasten bestätigten die E2- vermittelte geschlechtsdimorphe Regulation der Kollagen I und III mRNA in einer Herzgewebe- ähnlichen Umgebung. Zusätzlich konnte eine E2- induzierte geschlechtsspezifische Regulation der Gewebeeigenschaften beobachtet werden. Hierbei führte die E2- Behandlung weiblicher 3D- Zellkulturen zu einer eingeschränkten Kondensation, wogegen männliche 3D- Zellkulturen unter E2 stärker kondensierten und eine erhöhte Gewebefestigkeit aufwiesen. Abschließend bestätigten wir die inhibierende Wirkung von E2 auf die Kollagen I und III Expression in weiblichen Mäusen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Basierend auf unseren Daten nehmen wir an, dass die in der Klinik beobachteten Unterschiede in der kardialen Fibrose zwischen weiblichen und männlichen Patienten auf eine geschlechtsspezifische Regulation von Kollagen I und III auf E2 zurückzuführen sein könnte, welche durch die unterschiedliche Aktivierung der ER in weiblichen und männlichen kardialen Fibroblasten begründet ist.

**Dworatzek E**, Mahmoodzadeh S, Schriever C, Kusumoto K, Kramer L, Santos G, Fliegner D, Leung YK, Ho SM, Zimmermann WH, Lutz S, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific regulation of collagen I and III expression by 17beta-Estradiol in cardiac fibroblasts: role of estrogen receptors. *Cardiovasc Res*, 2019. 115(2): p. 315-327.

<https://doi.org/10.1093/cvr/cvy185>

### 3 Diskussion

Zwischen Männern und Frauen unterscheiden sich die kardialen Umbauprozesse bei der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie [3, 39], bei zunehmendem Alter [40] und bei der pathologischen Myokardhypertrophie [3]. Die verantwortlichen molekularbiologischen Mechanismen im Herzen sind bisher aber noch nicht im Detail verstanden. Dabei bilden die Identifikation und detaillierte Analyse dieser geschlechtsspezifischen Mechanismen die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte für beide Geschlechter. In diesem Kontext befasste sich die Forschung im Rahmen der vorgelegten Habilitationsschrift mit den molekularen Geschlechterunterschieden, die eine Rolle bei den kardialen Umbauprozessen in der Entwicklung der physiologischen sowie pathologischen Myokardhypertrophie spielen. Weiterhin wurden die ER-vermittelten Signalmechanismen, die zu geschlechtsspezifischen Ausprägungen beitragen, sowie die Rolle von E2 im Rahmen der kardialen Umbauprozesse näher betrachtet und analysiert.

#### **3.1 Geschlechterunterschiede in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie sind durch die geschlechtsdimorphe Aktivierung zellulärer Signalkaskaden vermittelt**

Geschlechterunterschiede in der Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie im Menschen und am Tiermodell wurden bereits beschrieben [39]. Die wenigen durchgeführten Untersuchungen in Athletinnen und Athleten lieferten kontroverse Ergebnisse [42-44]. Im Mausmodell zeigten die Weibchen, unabhängig vom freiwilligen oder erzwungenen Charakter des Trainings, eine signifikant stärkere Zunahme der Herzmasse im Vergleich zu den männlichen Tieren [49-51]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten wir in unserer Arbeit die beobachteten Geschlechterunterschiede in der Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie mit der beschriebenen signifikant höheren Zunahme der linksventrikulären Masse in den weiblichen Mäusen nach achtwöchigem Laufradtraining bestätigen (Manuskript 2.1, [143]).

Die mit dem Ausdauertraining verbundene Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie ist mit der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die am Wachstum des Herzens und somit an dem Adaptionsprozess beteiligt sind, assoziiert [21]. Zu ihnen gehören unter anderem die Phosphoinositide 3-Kinase-Serin/Threonin Protein Kinase B (*phosphoinositide 3-kinase-serin/threonin-specific kinase B*, PI3-K-AKT), die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK), die Glykogen Synthase Kinase 3 beta (*glycogen synthase kinase 3 beta*, GSK-3 $\beta$ ), die AMP-aktivierte Proteinkinase (*AMP dependent protein kinase*, AMPK) sowie die p70 s6 Kinase (*p70 s6 kinase*, S6K). Letztere phosphoryliert das ribosomale Protein S6, welches für

eine erhöhte Proteinsynthese in den Kardiomyozyten verantwortlich ist [14, 181]. Insbesondere die gesteigerte Phosphorylierung von AKT spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie [181]. Die detaillierte Betrachtung der verantwortlichen Mechanismen für die beobachtete geschlechtsdimorphe Ausprägung der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie stand bisher nur in zwei Arbeiten im Fokus [50, 51]. Konhilas und Kollegen konnten dabei in den Herzen weiblicher Mäuse eine vermehrte Aktivierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*, CaMK) gegenüber den männlichen Tieren nach freiwilligem Laufradtraining nachweisen [50]. Zudem zeigten nur die Weibchen eine Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  nach dreiwöchigem Training. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass im weiblichen Geschlecht der anti-hypertrophe Faktor GSK-3 $\beta$  inaktiviert wird und somit das physiologische Wachstum des weiblichen Herzens stärker gefördert wird [182, 183]. In der Studie von Foryst-Ludwig *et al.* konnte nach vierwöchigem Laufbandtraining eine Steigerung der Phosphorylierung von AKT in den weiblichen gegenüber den männlichen Mäusen nachgewiesen werden [51]. Diese korrelierte mit einer signifikant höheren Zunahme der linksventrikulären Masse in den weiblichen Tieren. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass die geschlechtsspezifische AKT-Aktivierung an der geschlechtsdimorphen Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie beteiligt ist.

Unsere Daten zeigten neben der signifikant stärkeren Zunahme der Herzmasse ebenfalls eine exklusive Phosphorylierung von AKT in den weiblichen Mäusen nach achtwöchigem Laufradtraining (Manuskript 2.1, [143]). Darüber hinaus konnten wir eine Erhöhung der Phosphorylierung der MAPK-p38, MAPK-ERK1/2 und dem ribosomalen Protein S6 in den weiblichen, aber nicht in den männlichen Mäusen beobachten. Bereits nach einer Woche freiwilligen Laufradtrainings wiesen die weiblichen Mäuse eine signifikante Zunahme in der Phosphorylierung von MAPK-ERK1/2 und dem Protein S6 im Herzen auf. Dass eine gesteigerte MAPK-ERK1/2 Phosphorylierung eine dominante Rolle bei der Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie spielt, konnte bereits in transgenen Mäusen mit einer konstitutiven MAPK-ERK1/2 Aktivierung bewiesen werden [184]. Weiterhin ist bekannt, dass der aktivierte MAPK-ERK1/2-Signalweg unter anderem für die Phosphorylierung des Proteins S6 in Kardiomyozyten verantwortlich ist und somit zu einer Zunahme der Proteinsynthese sowie Zellgröße der Myozyten führt [185-187]. Somit legen unsere Ergebnisse nahe, dass im Gegensatz zu den Herzen der männlichen Mäuse, die Weibchen bereits nach einer Woche freiwilligen Laufradtrainings auf molekularer Ebene adaptieren. Nach achtwöchigem Training beobachteten wir nur in den weiblichen Tieren eine relevante Erhöhung der Phosphorylierung von AKT und MAPK-p38 im Vergleich zu den männlichen Tieren. Für beide Signalkaskaden konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass sie

essentiell für die Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie sind [14]. Somit gelang es uns in dieser Arbeit weitere und neue verantwortliche Signalkaskaden für die beobachteten Geschlechterunterschiede in der physiologischen Myokardhypertrophie zu identifizieren. Interessanterweise zeigt sich in der Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie, ähnlich der pathologischen Myokardhypertrophie [83], dass bereits frühe Unterschiede in den kardialen Umbauprozessen zwischen weiblichen und männlichen Tieren zu einer geschlechtsdimorphen Form der Myokardhypertrophie und Funktion des Herzens führen können.

Hervorzuheben ist, dass das Ausdauertraining eine protektive Wirkung auf das kardiovaskuläre System hat [188] und als gesicherte Primärprävention vor Erkrankungen des Herz- Kreislauf- Systems gilt [189]. Zudem erwies sich die gezielte Aktivierung der mit der physiologischen Myokardhypertrophie assoziierten Signalkaskaden in der pathologischen Myokardhypertrophie als protektiv. So zeigte sich zum Beispiel, dass die Aktivierung des PI3- K- AKT Signalweges zu einem verbesserten Überleben der Mäuse im Modell der dilatativen Kardiomyopathie [190] und einer besser erhaltenen Herzfunktion sowie geringeren kardialen Fibrose bei drucklastinduzierter Myokardhypertrophie führte [191]. Aufgrund dessen besteht ein gesteigertes Interesse daran, die an der Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie beteiligten Mechanismen zu identifizieren und genauer zu analysieren. Eine gezielte Modulation dieser Mechanismen könnte dabei eine neue Strategie darstellen, die Entwicklung der pathologischen Myokardhypertrophie zu verhindern und die Therapie zu verbessern [21, 192].

### **3.2 Geschlechterunterschiede in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie werden durch Östrogenrezeptor beta vermittelt**

Bisher war nicht bekannt, ob die ER, ähnlich wie bei der pathologischen Myokardhypertrophie, eine modulierende Rolle auf die geschlechtsspezifischen Mechanismen in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie nehmen. Unsere Studie zeigte erstmalig welche Rolle der ER $\alpha$  und ER $\beta$  dabei in beiden Geschlechtern spielen (Manuskript 2.1, [143]). Interessanterweise zeigten die weiblichen ERKO- Mäuse ein generell eingeschränktes Laufverhalten, was auf eine noch unbekannte aber essentielle Rolle des ER $\alpha$  im Bewegungsverhalten von weiblichen Tieren hindeutet. Einige Studien legen nahe, dass der zugrundeliegende Mechanismus für das von uns beobachtete eingeschränkte Bewegungsverhalten dabei auf Effekte von ER $\alpha$  im zentralen Nervensystem zu suchen sind [193, 194]. Männliche ERKO- Mäuse wiesen dagegen ein vergleichbares Laufverhalten und eine ähnliche Zunahme der linksventrikulären Masse gegenüber den männlichen WT- Mäusen auf. Dieser Befund weist darauf hin, dass ER $\alpha$  keine Rolle bei der Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie in männlichen

Mäusen spielt. Im Gegensatz dazu konnte in den BERKO- Mäusen, trotz vergleichbarer Laufergebnisse zu den WT- Mäusen, in keinem der beiden Geschlechter eine Zunahme der linksventrikulären Masse nach acht Wochen beobachtet werden. Zudem fand in den weiblichen BERKO- Mäusen, vergleichend zu den weiblichen WT- Mäusen, keine Aktivierung der oben genannten wachstumsstimulierenden Signalwege statt. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass der benötigte ER $\beta$ , wie bereits in weiblichen Rattenherzen, im Skelettmuskel und Ratten- Myoblasten beschrieben [195-197], für die Aktivierung des PI3- K- AKT Signalweges in den weiblichen BERKO- Maus Herzen fehlt. Daten, die eine direkte Interaktion von ER $\beta$  und AKT nachwiesen [198], bestärken diese Annahme. Obwohl wir in den männlichen WT- Mäusen eine signifikante Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie nach achtwöchigem Training beobachteten, gelang es uns in dieser Studie nicht die verantwortlichen Mechanismen, die durch ER $\beta$  moduliert werden, zu identifizieren. Dies könnte auf die zwei gewählten Zeitpunkte, eine und acht Wochen nach freiwilligem Laufradtraining, unserer Analysen zurückzuführen sein. Da beschrieben worden ist, dass die involvierten wachstumsstimulierenden Signalkaskaden im Herzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiviert werden können [14, 50], liegt es nahe anzunehmen, dass wir die Adaptionprozesse, die zwischen den zwei Zeitpunkten lagen, in unserer Studie nicht detektiert haben.

### **3.3 Östrogenrezeptor beta vermittelt die geschlechtsdimorphe Adaption der Mitochondrien in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie**

Neben der Identifikation neuer möglicher verantwortlicher Signalwege für die Geschlechterunterschiede in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie, gelang es uns zusätzlich zu demonstrieren, dass die Expression verschiedener Schlüsselregulatoren der mitochondrialen Funktion geschlechterabhängig durch das Training reguliert werden (Manuskript 2.1, [143]). Dabei wurde in den weiblichen, aber nicht die männlichen WT- Mäusen, eine trainingsinduzierte Zunahme des Proteinniveaus der Transkriptionsfaktoren: Nukleärer Respiratorischer Faktor- 1 und - 2 (*nuclear respiratory factor- 1, - 2, NRF- 1 und - 2*) und dem Myozyten- spezifischen Enhancer- Faktor 2A (*Myocyte- specific enhancer- factor 2A, Mef2a*) sowie vier ausgewählter Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette, beobachtet. Die fehlende Zunahme der Expression von NRF- 1 und - 2 und Induktion der Proteine der mitochondrialen Atmungskette in den weiblichen BERKO- Mäusen nach achtwöchigem Training sowie bereits publizierte Daten zur E2- und ER $\beta$ - vermittelten Regulation mitochondrialer Proteine über NRF- 1 und - 2 in verschiedensten Geweben und Zelltypen [199-203], weisen dabei auf die direkte Beteiligung von ER $\beta$  hin. Diese Annahme kann zusätzlich durch die von uns beobachtete Induktion der mRNA von NRF- 1, - 2 und Mef2a nach E2- und spezifischen ER $\beta$ - Agonisten

Behandlung in einer humanen, atrialen Kardiomyozyten-ähnlichen Zelllinie bestätigen werden.

Zusätzlich zur Expressionsveränderung mitochondrialer Schlüsselregulatoren, kann die trainingsinduzierte Adaption der Mitochondrienfunktion über die Zunahme oder Abnahme der Mitochondriengröße reguliert werden [204]. Dieser Prozess wird über die Fission und Fusion der Mitochondrien gesteuert [205]. In beiden Geschlechtern der WT-Mäuse konnten wir einen Anstieg der Anzahl kleiner Mitochondrien durch das achtwöchige Laufradtraining beobachten. Dagegen konnten wir in den weiblichen und männlichen BERKO-Mäusen keine Veränderung in der Größe der Mitochondrien nachweisen. Zusätzlich kam es zu einer Abnahme der Anzahl der großen Mitochondrien, welche aber nur in den weiblichen WT-Mäusen, assoziiert mit einer signifikanten Reduktion des Fusionsproteins Mitofusin-2, signifikant war. Somit schließen wir aus diesen Daten, dass es in den Herzen der weiblichen Mäuse zu einer höheren Umwandlungsrate der großen Mitochondrien in kleinere Mitochondrien im Vergleich zu den männlichen Tieren kommt.

Zusammenfassend schließen wir aus unseren Ergebnissen, dass die trainingsinduzierte, signifikant stärkere Zunahme der linksventrikulären Masse in den weiblichen Mäusen auf der Aktivierung wachstumsfördernder Signalkaskaden sowie der effizienteren Adaption der Mitochondrien, vermittelt über den ER $\beta$ , gegenüber den männlichen Tieren basiert.

### **3.4 Die altersbedingten kardialen Umbauprozesse sind durch eine geschlechtsspezifische Regulation der extrazellulären Matrix gekennzeichnet**

Weltweit steigt die Lebenserwartung der Menschen an, ist aber durch eine zunehmende Anfälligkeit gegenüber verschiedenen chronischen Erkrankungen, wie denen des Herz-Kreislauf-Systems begleitet, wodurch die Lebensqualität erheblich negativ beeinträchtigt wird [1]. Um die höhere Lebenserwartung mit einer verbesserten Lebensqualität im Alter zu ergänzen, müssen nicht nur die Behandlungen der chronischen Erkrankungen, sondern auch die Präventionsmaßnahmen optimiert werden. Das tiefere Verständnis über die kardialen Umbauprozesse während des Alterns, die für die nachlassende Kompensationsfähigkeit des Herzens und somit für die steigende Anfälligkeit gegenüber chronischen Erkrankungen verantwortlich sind, könnte hierfür die Voraussetzung sein.

In unserer Arbeit konnten wir mittels Vergleich verschiedener Altersstufen zeigen, dass es zu geschlechtsspezifischen altersabhängigen Veränderungen einzelner extrazellulärer Matrixproteine kommt (Manuskript 2.4, [206]). In den Herzen der jüngeren Probandinnen fanden wir eine geringere Proteinmenge von Kollagen I, III und VI, von TIMP3 sowie von Smad2 und Smad3 gegenüber den Männern aus der jüngeren Altersstufe. Dagegen kehrte sich das Verhältnis mit zunehmendem Alter um, und die zu detektierende Menge der genannten Proteine war in den älteren Frauen größer als bei den Männern im vergleichbaren

Alter. Generell konnte somit mit zunehmendem Alter eine Abnahme der genannten Proteine in den Herzen der Männer und ein Anstieg in den weiblichen Herzen beobachtet werden. Diese Befunde sind im Einklang mit Untersuchungen in Mäusen und Ratten, die ebenfalls eine Veränderung einzelner extrazellulärer Matrixproteine, wie MMP und TIMP, im Alter zeigten [207-209]. Dass ein Anstieg der MMP und von TIMP1 zu einer altersbedingten Fibrose beitragen, wurde ebenfalls bereits dokumentiert [210]. Zudem konnte eine Studie den altersbedingten Anstieg der Kollagen I Proteinmenge sowie Faserdicke im humanen Herzen nachweisen [56]. Eine andere Untersuchung legt dabei nahe, dass dieser Anstieg hauptsächlich über die Neusynthese von Kollagen vermittelt wird [211]. Insbesondere die erhöhte Kollagenablagerung gilt als ursächlich für die beobachtete Einschränkung der diastolischen Herzfunktion im Alter [212, 213]. Diese wiederum wird als prädisponierend für eine spätere Entwicklung einer HFpEF diskutiert [17, 40, 53, 214], deren zunehmende Entwicklung in der älteren Bevölkerung zu beobachten ist [215-217]. Zudem kann eine erhöhte Kollagenmenge im Herzen zu Herzrhythmusstörungen führen [218]. Da Frauen im Alter eher eine Entwicklung von HFpEF als Männer aufzeigen [8, 214, 219] und anfälliger gegenüber einer medikamenteninduzierten Verlängerung des QT-Intervalls sowie Herzrhythmusstörungen sind [220-223], könnte der beobachtete Anstieg der Proteine von Kollagen I und III sowie von TIMP3 in den alternden Frauenherzen zu einer späteren Entwicklung der genannten Pathologien beitragen.

Erwähnt werden muss aber, dass die von uns gezeigte altersabhängige Zunahme der extrazellulären Matrixproteinmenge in den weiblichen Herzen geringer ausfiel als der Anstieg der Fibrose-assoziierten Gene und Proteine in den männlichen Patienten mit Aortenstenose, welcher zu einer signifikant höheren Induktion der Fibrose in den männlichen Herzen führte (Manuskript 2.2 und 2.3, [178, 179]). Zudem konnten wir keine Erhöhung von Periostin sowie gesteigerte Kollagenablagerung in den weiblichen Herzen beobachten. Diese Befunde weisen darauf hin, dass der altersbedingte Anstieg der extrazellulären Matrixproteine in den Herzen der Frauen als physiologischer Anpassungsprozess verstanden werden kann. Ein weiterer Punkt ist, dass wir im Gegensatz zu den männlichen Patienten mit Aortenstenose, welche eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von Smad2 zeigten (Manuskript 2.2, [178]), nur eine erhöhte Phosphorylierung von Smad3 und einen Anstieg der Proteinmenge von Smad4 in den Herzen der älteren Probandinnen beobachteten. Bekannt ist, dass TGF- $\beta$ 1 seine fibrotische Wirkung hauptsächlich über die Phosphorylierung der Smad2 und Smad3 Proteine vermittelt. Dabei bilden die aktivierten Smad-Proteine gemeinsam mit Smad4 heterodimere oder trimere Komplexe, die daraufhin in den Zellkern lokalisieren und zusammen mit anderen Ko-Regulatoren die Transkription verschiedener fibrotischer Gene, wie zum Beispiel die Expression von Kollagen regulieren [224]. In diesem Zusammenhang wurde für die TGF- $\beta$ 1 und Smad2/Smad3-vermittelte

Genregulation ein hierarchisches Model beschrieben, wobei es zu einer zeitversetzten Aktivierung sowie unterschiedlichen regulatorischen Rollen der beiden Smad- Proteine kommt [225]. Hierbei wurde der Komplex aus Smad3 und Smad4 als Vermittler für die kurzfristigen Regulationen nach TGF-  $\beta$ 1 Aktivierung beschrieben, wogegen Smad2 im Komplex mit Smad4 als Transmitter nach länger anhaltender TGF- $\beta$ 1 Stimulation dient und letztendlich zur Fibrose führt. Dieser Befund unterstreicht unsere Annahme, dass es sich bei dem Anstieg der extrazellulären Matrixproteine in den Herzen der älteren Frauen um keinen pathologischen Umbauprozess handelt.

Die genauen Gründe sowie verantwortlichen Mechanismen, die zu den altersbedingten Veränderungen der extrazellulären Matrix im humanen Herzen führen, sind nicht bekannt. Mögliche Auslöser für die Umbauprozesse können unter anderem in einer altersbedingten Abnahme der Durchblutung, einem veränderten Metabolismus, einer verringerten Dehnbarkeit der Gefäße und somit einem zunehmend ansteigenden Blutdruck liegen. Vorstellbar ist, dass die darauffolgende Adaption des Herzens, ähnlich wie bei der pathologischen Myokardhypertrophie, hauptsächlich über die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix und dabei insbesondere über die Kollagensynthese [226], realisiert wird. Somit stellen sie auf der einen Seite einen Adaptionsmechanismus dar, um die Integrität und Funktion des Herzens aufrecht zu erhalten, und tragen auf der anderen Seite zusätzlich dazu bei, dass das alternde Herz in seiner Kompensationsfähigkeit eingeschränkt wird. Während der kardialen Umbauprozesse ist einer der hauptverantwortlichen Mechanismen die Regulation der Kollagene und anderer fibrotischer Gene auf transkriptioneller Ebene zu finden [29]. Da bereits beschrieben worden ist, dass einige der extrazellulären Matrixkomponenten in ihrer Genexpression durch die Sexualhormone moduliert werden [58, 176, 227], liegt es nahe anzunehmen, dass bei den altersbedingten Umbauprozessen der extrazellulären Matrix die Sexualhormone eine modulierende Rolle spielen. Insbesondere für E2 ist eine Veränderung der Konzentration mit dem Alter in beiden Geschlechtern beschrieben, die mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergeht [86]. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass der Effekt von E2 im Herzen dabei geschlechtsspezifisch ausfallen kann [58, 228, 229]. Beispielsweise erhöht E2 die mRNA von Kollagen I und III in männlichen kardialen Fibroblasten, wogegen E2 beide Kollagene in weiblichen Zellen unterdrückt [58]. Demnach könnte E2 für die Repression der extrazellulären Matrixgene in den Herzen der Frauen verantwortlich sein. Aus diesem Grund nehmen wir an, dass in den von uns untersuchten älteren Frauen, wobei es sich um Probandinnen im post- menopausalen Alter handelt, ein erniedrigter E2- Spiegel für die Erhöhung der extrazellulären Matrixkomponenten im alternden Herzen verantwortlich sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Veränderung einzelner extrazellulärer Matrixkomponenten im Herzen kommt, die geschlechtsspezifisch ausfällt. Zudem ist es vorstellbar, dass die geschlechtsspezifischen Umbauprozesse der extrazellulären Matrix im alternden Herzen ebenfalls zu später auftretenden Geschlechterunterschieden in der Pathologie beitragen.

### **3.5 Geschlechterunterschiede bei pathologischen kardialen Umbauprozessen**

Nachdem wir Geschlechterunterschiede in den verantwortlichen Mechanismen der physiologischen Myokardhypertrophie nach Ausdauertraining und während des Alterns nachweisen konnten, ergaben sich nunmehr auch Nachweise für geschlechtsspezifische kardiale Umbauprozesse in der pathologischen Myokardhypertrophie (Manuskript 2.2. und 2.3, [178, 179]). Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass Frauen und Männer dabei unterschiedlich adaptieren, wobei kardial erkrankte Männer eher zu maladaptiven kardialen Umbauprozessen und der Ausbildung einer exzentrischen Myokardhypertrophie neigen [58, 60-62]. Die Daten unserer Studie bestätigen diese Befunde und zeigten, dass Männer mit Aortenstenose vorwiegend eine maladaptive Form, wogegen Patientinnen eher eine adaptive Form der Myokardhypertrophie entwickeln (Manuskript 2.2, [178]). Zudem gelang es uns erstmalig nachzuweisen, dass die dimorphe Adaptation in der pathologischen Myokardhypertrophie zwischen Männern und Frauen ebenfalls einen Einfluss auf das Überleben nach Aortenklappenersatz hat. Frauen, die eine maladaptive Form der Myokardhypertrophie entwickelten, trugen dabei ein signifikant höheres Mortalitätsrisiko im Vergleich zu Patientinnen mit einer adaptiven Form der Myokardhypertrophie nach Aortenklappenersatz. Bei den männlichen Patienten hatte die Form der pathologischen Myokardhypertrophie keinen Einfluss auf das post-operative Überleben. Die Ergebnisse unserer Studie zeigten somit auf, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in den pathologischen kardialen Umbauprozessen nicht nur zu Unterschieden in der Form und Funktion bei Herzerkrankungen beitragen, sondern auch einen Einfluss auf den Therapieverlauf und sogar das Überleben nehmen können. Folglich ist das Verständnis über die verantwortlichen regulatorischen Mechanismen, die zu den beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschieden führen, wichtig, und hilft potenziell schützende Mechanismen für Frauen und Männern zu identifizieren.

Dass bestehende prä-operative Geschlechterunterschiede eine Rolle in der Reversibilität der Myokardhypertrophie nach der operativen Entlastung des Herzens einnehmen, konnten wir bereits in einer unserer vorangegangenen Studien zeigen [58]. Hierbei war die post-operative Reversibilität der Herzhypertrophie in den Frauen bereits nach einer Woche signifikant stärker als in den Männern ausgeprägt. Diese Geschlechterunterschiede konnten wir in dieser Studie bestätigen und zeigten darüber hinaus, dass die Rückbildung der

Hypertrophie bei Frauen selbst nach vier Jahren stärker ausgeprägt gegenüber den Männern ausfiel. Somit konnten wir auch in dieser Untersuchung zeigen, dass die geschlechtsdimorphen, frühen post- operative Unterschiede nach Aortenklappenersatz auch in der späteren post- operativen Phase bestehen, vergleichbar zu den Befunden der physiologischen (Manuskript 2.1, [143]) und pathologischen Myokardhypertrophie [83].

### **3.5.1 Geschlechterunterschiede in der kardialen Fibrose**

Vorhandene Geschlechterunterschiede in der Entwicklung der kardialen Fibrose bei verschiedenen Herz- Kreislauf- Erkrankungen wurden mehrfach beschrieben. Männliche Patienten mit Aortenstenose [62, 64], hypertropher Kardiomyopathie [65], koronarer Herzerkrankung [66] und Atherosklerose [67] zeigen, im Vergleich zu Frauen mit einem vergleichbaren Grad der Pathologie, eine signifikant höhere Kollagenablagerung im Herzen. Erste Hinweise darauf, dass die in unserer Studie eingeschlossenen Patienten eine ausgeprägtere Fibrose gegenüber den Patientinnen aufweisen, ergaben sich bereits aus einer unseren vorangegangenen Studien [58]. Hier zeigten wir, dass Patienten eine höhere Genexpression von Kollagen I und III sowie MMP- 2 und - 9 im Vergleich zu den weiblichen Herzen aufwiesen. In der jetzigen Arbeit konnten wir diese Vermutung untermauern und zeigten, dass Männer mit Aortenstenose prä- operativ eine signifikant höhere kardiale Kollagenablagerung gegenüber Frauen aufwiesen (Manuskript 2.2, [178]). Dies war verbunden mit einer signifikanten erhöhten Proteinmenge an TGF-  $\beta$ 1, Phosphorylierung von Smad2 und induzierten Proteinmenge des TGF-  $\beta$ 1 Zielgens Periostin [230] in den Herzen der Männer gegenüber den Patientinnen mit Aortenstenose. Geschlechterunterschiede in der Menge an Periostin konnte bereits im Blut von Patienten und Patientinnen mit einer Herzinsuffizienz gefunden werden, wobei in Serumproben von Männern gegenüber Frauen eine größere Menge an Protein gemessen wurde [231]. In unserer Studie gelang es uns nun zu zeigen, dass eine signifikant höhere kardiale Expression von Periostin mit einer erhöhten kardialen Fibrose und maladaptiven Myokardhypertrophie in Männern assoziiert ist.

### **3.5.2 Frauen und Männer mit Aortenstenose unterscheiden sich in der Expression Fibrose- und Inflammations- assoziierter Gene**

Um weitere molekularbiologische Mechanismen, die an den Geschlechterunterschieden in den pathologischen kardialen Umbauprozessen beteiligt sind zu identifizieren, untersuchten wir eine repräsentative Sub- Kohorte der Patienten und Patientinnen mit Aortenstenose mittels einer Chip- basierten Genexpressionsanalyse (Manuskript 2.3, [179]). Hierbei identifizierten wir eine Gruppe bekannter Hypertrophie- assoziierter Gene, die durch die Drucklast auf das Herz in gleicher Weise in beiden Geschlechtern induziert waren, wie den Präkursor des atrialen naturetischen Peptids (*naturetic peptide A*, *NPPA*) und *MEF2A*.

Dagegen fanden wir aber auch eine Vielzahl an krankheitsabhängigen verändert Genen, die in Männern vergleichend zu Frauen in einem unterschiedlichen Ausmaß oder gegensätzlich reguliert waren. Das traf auf eine Vielzahl Fibrose- assoziierter Gene zu, welche signifikant stärker in den Patienten gegenüber den Patientinnen mit Aortenstenose induziert waren. In diesem Kontext fanden wir in den männlichen Herzen mittels einer *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)- Signalweg- Analyse eine signifikante Anreicherung von Genen, die zu den KEGG- Signalwegen der extrazellulären Matrix- Rezeptor- Interaktion, des Renin- Angiotensin Systems sowie des TGF-  $\beta$ 1 Signalweges gehören. Diese Daten sind im Einklang mit der von uns gezeigten erhöhten Proteinmenge an TGF-  $\beta$ 1 sowie der Phosphorylierung des TGF-  $\beta$ 1 Vermittlerproteins Smad2 in den untersuchten Herzen der Patienten mit Aortenstenose (Manuskript 2.2., [178]). Darüber hinaus konnten wir Periostin als signifikant und am stärksten induziertes Gen in den Patienten mit Aortenstenose gegenüber den männlichen Kontrollherzen identifizieren, dessen Regulation auf mRNA- Ebene sich auf Proteinebene widerspiegelt (Manuskript 2.2, [178]). Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass die männlichen Herzen unter pathologischer Drucklast stärker mit der Entwicklung einer kardialen Fibrose reagieren als Frauen. Dieser Unterschied beruht dabei bereits auf einer geschlechtsspezifischen Regulation der mRNA fibrotischer Gene (Manuskript 2.3, [179] und [58]), führt infolgedessen zu unterschiedlichen Mengen an extrazellulären Matrixproteinen und Schlüsselregulatoren sowie letztendlich zu einer signifikant höheren Kollagenablagerung in den Herzen der Männer gegenüber den Patientinnen mit Aortenstenose (Manuskript 2.2., [178]).

Im Gegensatz zu den Patienten fanden wir in den Herzen der Frauen mit Aortenstenose sogar eine Inhibierung fibrotischer Gene. Im Spezifischen identifizierten wir, gegenüber den weiblichen Kontrollherzen, eine signifikant geringere Expression von TGF-  $\beta$ 1 aber auch von Angiotensinogen (*angiotensinogen*, AGT), einem Vorläuferprotein von Angiotensin II, das ebenfalls zu der Aktivierung kardialer Fibroblasten und somit erhöhten Synthese und Sezernierung extrazellulärer Proteine führt [232]. Darüber hinaus fanden wir in den Herzen der Patientinnen, gegenüber den weiblichen Kontrollen, eine Unterdrückung von Genen, die in der KEGG- Signalweg- Analyse den Zytokin- , Chemokin- und Inflammations- assoziierten Wegen signifikant zuzuordnen waren. Bekannt ist, dass Kardiomyozyten unter pathologischen Umständen Zytokine produzieren sowie sezernieren, wodurch eine pro-fibrotische Umgebung geschaffen wird und es zur Aktivierung und Proliferation der residenten Fibroblasten kommt [23]. Zudem fördern Chemokine die Einwanderung von Fibrozyten, welche an der Entstehung der kardialen Fibrose beteiligt sind [233], und erhöhen zudem die Migration von Leukozyten im erkrankten Herzen. Die Unterdrückung dieser Mechanismen in den weiblichen Herzen unter Drucklast könnte somit in den Frauen protektiv

wirken und zu einem geringeren Grad der Fibrose im Vergleich zu den Männern mit Aortenstenose führen.

### **3.6 Geschlechtsspezifische Regulation von Kollagen I und III durch 17 $\beta$ - Östradiol und Östrogenrezeptoren in kardialen Fibroblasten**

Untersuchungen unserer sowie anderer Arbeitsgruppen zeigten am Tiermodell, dass E2 und die ER in beiden Geschlechtern eine regulatorische Rolle in der Entwicklung der Fibrose einnehmen [71, 73, 104, 118, 120, 153]. Wir beschrieben in isolierten kardialen Fibroblasten von männlichen und weiblichen Ratten eine unterschiedliche Regulation von Kollagen I und III durch E2 [58]. Hierbei konnte eine inhibierende Wirkung von E2 auf beide Kollagene in den Zellen weiblicher Ratten, dagegen eine Induktion von Kollagen I und III in den männlichen Zellen durch E2 beobachtet werden. Um die E2- und ER- vermittelten Effekte auf die Entstehung der kardialen Fibrose in beiden Geschlechtern detaillierter zu verstehen, und zukünftig therapeutisch präzise zu modulieren, haben wir in unserer Studie die regulatorische Rolle von E2 und den ER auf die Expression von Kollagen I und III in männlichen und weiblichen kardialen Fibroblasten analysiert (Manuskript 2.5, [234]). Obwohl die E2- vermittelte Modulation der Expression von Kollagen I und III [235-237] sowie die geschlechtsspezifische Regulation verschiedener Gene und Proteine bereits im Kontext anderer Zellen beschrieben wurde [58, 177, 229, 238, 239], blieb der verantwortliche Mechanismus bisher unvollständig verstanden. Im Zusammenhang mit der geschlechtsspezifischen E2- induzierten Regulation von Kollagen I und III in den kardialen Fibroblasten konnten wir nun erstmals nachweisen, dass sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  darin involviert sind (Manuskript 2.5, [234]). Dabei zeigte sich in den weiblichen Zellen der aktivierte ER $\alpha$  verantwortlich für die inhibierende Wirkung auf die Expression von Kollagen I und III, wogegen die alleinige Aktivierung von ER $\beta$  zur Induktion beider Kollagene in den männlichen Zellen führte.

#### **3.6.1 Geschlechtsspezifische Aktivierung beider Östrogenrezeptoren in kardialen Fibroblasten durch 17 $\beta$ - Östradiol**

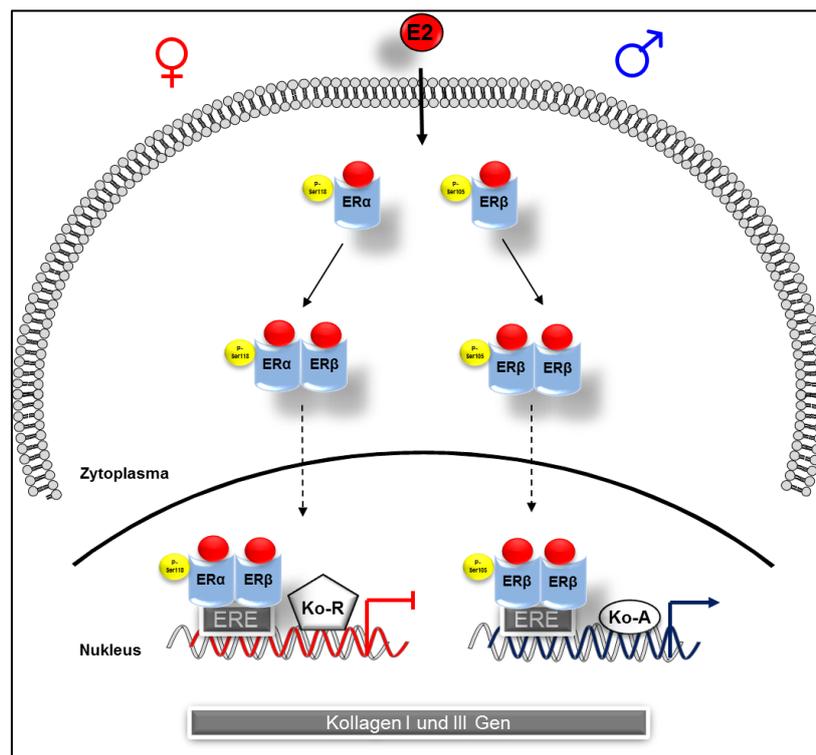
Corthesy und Kollegen fanden in Leberzellen, dass ein unterschiedliches Expressionsniveau beider ER zwischen den Geschlechtern für die E2- vermittelte geschlechtsspezifische Regulation des Vitellogenine- Gens verantwortlich ist [238]. Im Rahmen unserer Untersuchungen fanden wir eine vergleichbare Menge an ER $\alpha$ - Protein in den kardialen Fibroblasten beider Geschlechter sowie ein höheres ER $\beta$ - Proteinniveau in weiblichen gegenüber männlichen Zellen (Manuskript 2.5, [234]). Somit schlussfolgerten wir, dass Unterschiede in der Proteinmenge von ER $\alpha$  und ER $\beta$  in den kardialen Fibroblasten weiblicher und männlicher Ratten kein möglicher Grund für die beobachtete

geschlechtsspezifische Aktivierung der ER sein können. Neben der zellulären Proteinmenge beider Rezeptoren spielen post-translationelle Modifikationen, wie zum Beispiel die Phosphorylierung, eine ebenso wichtige Rolle bei der Aktivierung beider ER als Transkriptionsfaktoren [240-242]. Insbesondere die E2-induzierte Phosphorylierung von Serin 118 des ER $\alpha$ 's und von Serin 105 im ER $\beta$  wurde als essentiell für die Bindungskapazität beider ER gegenüber E2 als auch für die Proteinstabilität, die Dimerisierung, die sub-zelluläre Lokalisation, die DNA-Bindung und die Interaktion mit anderen Ko-Regulatoren beschrieben [240, 241]. Daher analysierten wir, ob eventuelle geschlechtsspezifische Unterschiede in der Phosphorylierung beider ER nach E2-Behandlung in den kardialen Fibroblasten nachzuweisen sind. Durch die Inkubation mit E2 konnten wir eine exklusive Phosphorylierung am Serin 118 des ER $\alpha$ -Proteins in den kardialen Fibroblasten weiblicher Ratten finden. Dagegen kam es nur in den männlichen Zellen zu einer E2-induzierten Phosphorylierung von Serin 105 im ER $\beta$ . Somit konnten wir mittels unserer Analysen eine E2-abhängige, geschlechtsspezifische Aktivierung beider ER zeigen, die in der von uns angenommenen Weise für die geschlechtsdimorphe Regulation von Kollagen I und III verantwortlich ist. Als ursächlich für die unterschiedliche Phosphorylierung beider ER durch E2 könnte eine E2-induzierte, geschlechtsspezifische Aktivierung von oberhalb der ER gelegenen Signalkaskaden, wie MAPK, PI3-K-AKT, Cyclin-abhängige Kinase 7 (*cyclin-dependent kinase 7*, Cdk7) und GSK-3 $\beta$  [240, 242] in den kardialen Fibroblasten in Frage kommen. Welche dieser Signalkaskaden in den kardialen Fibroblasten für die E2-induzierte geschlechtsdimorphe Aktivierung der ER verantwortlich ist, bleibt jedoch bislang ungeklärt und muss in weiterführenden Untersuchungen ermittelt werden.

### **3.6.2 Die 17 $\beta$ -Östradiol aktivierten Östrogenrezeptoren binden geschlechtsdimorph am Promoter von Kollagen I und III**

Neben der von uns beschriebenen geschlechtsspezifischen ER-Aktivierung konnten wir die unterschiedliche Bindung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  an die Genpromotoren von Kollagen I und III in den weiblichen und männlichen kardialen Rattenfibroblasten nachweisen (Manuskript 2.5, [234]). Dabei bindet ER $\alpha$  gemeinsam mit ER $\beta$  an zwei putative ERE innerhalb des Promotors von Kollagen I und III in den weiblichen Zellen, wogegen in den männlichen Fibroblasten E2 die alleinige Bindung von ER $\beta$  an den Promotoren beider Gene induzierte. In Übereinstimmung mit unseren Befunden zeigten Powell und Kollegen, dass die selektive Aktivierung des ER $\alpha$ s entweder zur Bildung eines ER $\alpha$ -Homodimeres oder eines ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Heterodimeres führen kann [243]. Im Gegensatz dazu führt die selektive Aktivierung des ER $\beta$  zur alleinigen Bildung eines Homodimeres [243]. Obwohl beide ER dieselbe Affinität gegenüber E2 haben [244] und an die gleichen ERE-Motive binden [245],

wie zum Beispiel in unserer Studie innerhalb der Promotoren von Kollagen I und III, können sie die Transkription ihrer Zielgene unterschiedlich regulieren. Nach der Bindung beider ER innerhalb des Genpromotors folgt die Rekrutierung verschiedener Ko-Regulatoren, welche dann entweder für die Induktion oder Inhibierung der Genexpression verantwortlich sind [84]. Die Existenz spezifischer Ko-Regulatoren von ER $\alpha$  und ER $\beta$  ist bereits beschrieben und es zeigte sich, dass diese hauptsächlich für die Unterschiede in der E2- und ER-vermittelten Regulation der Genexpression verantwortlich sind [84]. Basierend darauf nehmen wir an, dass die beobachtete geschlechtsdimorphe Bindung der ER an die Promotoren von Kollagen I und III durch die Bindung unterschiedlicher Ko-Regulatoren begleitet wird (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der 17 $\beta$ -Östradiol und Östrogenrezeptor vermittelten geschlechtsspezifischen Regulation von Kollagen I und III in kardialen Fibroblasten.** In weiblichen kardialen Fibroblasten kommt es nach der Behandlung mit E2 zur Phosphorylierung von ER $\alpha$  am Ser118. Dieser bildet daraufhin gemeinsam mit ER $\beta$  ein Heterodimer. Zusammen translozieren beide ER in den Zellkern und binden an die identifizierten ERE innerhalb der Promotoren des Kollagen I und III Gens. Anschließend erfolgt die Rekrutierung eines oder mehrere Ko-Repressoren wodurch es zur Inhibierung der mRNA beider Kollagentypen in den weiblichen Zellen kommt. In männlichen kardialen Fibroblasten führt die Inkubation mit E2 zur Phosphorylierung des ER $\beta$  am Ser105, der danach mit ER $\beta$  ein Homodimer bildet, welches in den Zellkern transloziert. Dort bindet das ER $\beta$ -Homodimer an die ERE der Promotoren von Kollagen I und III. Diese ist gefolgt von der Rekrutierung eines oder mehrerer Ko-Aktivatoren, welche zur Induktion der mRNA von Kollagen I und III in den männlichen kardialen Fibroblasten führt. E2: 17 $\beta$ -Östradiol, ER $\alpha$ / $\beta$ : Östrogenrezeptor alpha/beta, ERE: Östrogen-Responsives-Element, Ser: Serin, Ko-A: Ko-Aktivator, Ko-R: Ko-Repressor, P: Phosphorylierung. Modifizierte Abbildung [246].

Demnach ist in unserer Untersuchung nach der Bindung beider ER in den weiblichen kardialen Rattenfibroblasten die Rekrutierung eines oder mehrerer Ko-Repressoren als ursächlich für die Inhibition der Genexpression von Kollagen I und III vorstellbar. Dagegen vermuten wir in den männlichen Zellen eine durch die Bindung von ER $\beta$  hervorgerufene Rekrutierung eines oder mehrerer Ko-Aktivatoren, welche verantwortlich für die Induktion der Genexpression beider Kollagentypen sind.

### **3.6.3 Die geschlechtsspezifische Rolle der Östrogenrezeptoren bei der kardialen Fibrose**

Dass ER $\alpha$  sowie ER $\beta$  auf die Entwicklung der kardialen Fibrose in beiden Geschlechtern einen modulierenden Einfluss nehmen, konnte bereits in einer Vielzahl von Tiermodellen für kardiovaskuläre Erkrankungen des Menschen gezeigt werden [71, 73, 104, 118, 153, 247].

In männlichen Mäusen führte die Deletion des ER $\beta$  zu einer geringeren kardialen Fibrose gegenüber den WT- Mäusen nach chronischer Druckbelastung des Herzens [73]. Die *in-vivo* Daten weisen darauf hin, dass der ER $\beta$  einen fördernden Effekt auf die kardiale Fibrose im männlichen Geschlecht hat. Diese Vermutung kann durch unsere Befunde bestätigt werden und sie deuten darauf hin, dass dies teilweise über die E2- ER $\beta$  induzierte Erhöhung der mRNA und Proteine von Kollagen I und III in den männlichen kardialen Fibroblasten vermittelt wird (Manuskript 2.5, [234]). Im Gegensatz dazu wurde in weiblichen Mäusen beobachtet, dass die Aktivierung von ER $\alpha$  [104] aber auch von ER $\beta$  [247] den Schweregrad der Fibrose im Herzen abmildert. Dagegen führt eine Deletion von ER $\beta$  zu einer verstärkten Entwicklung der Fibrose im weiblichen Herzen [71, 73, 153]. Basierend darauf wird angenommen, dass sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  an der Eindämmung der kardialen Fibrose im weiblichen Herzen beteiligt sind. Auch hier untermauern unsere Daten in den weiblichen kardialen Fibroblasten diese Vermutung und liefern mit der gezeigten E2- induzierten Aktivierung von ER $\alpha$ , der gemeinsamen Bindung beider ER am Promoter von Kollagen I und III sowie der daraus resultierenden Inhibition der Expression einen möglichen verantwortlichen Mechanismus.

Obwohl bereits mehrere Studien den inhibierenden Effekt von E2 und den ER auf die kardiale Fibrose in weiblichen Mäusen und Ratten nachgewiesen haben, ist der detaillierte Mechanismus noch nicht geklärt. Die Ergebnisse einer Studie von Pedram und Kollegen weisen darauf hin, dass der E2- aktivierte ER $\beta$  die Protein Kinase A (*protein kinase A*, PKA) und AMP- aktivierte Proteinkinase (*AMP- activated protein kinase*; AMPK) in kardialen Fibroblasten aktiviert. Dadurch kommt es zur Inhibition der Rho- assoziierte Proteinkinase (*Rho- associated protein kinase*, ROCK) Aktivität und somit zur E2- und ER $\beta$ - vermittelten anti- fibrotischen Wirkung [247]. Ähnliche Daten lieferten Lee und Kollegen und zeigten, dass nach E2- Behandlung, ER $\alpha$  die RhoA- ROCK- vermittelte Induktion des Strukturproteins

Aktin inhibiert und somit die Entwicklung der kardialen Fibrose unterdrückt wird [118]. Zusätzlich bietet die in unserer Studie gezeigte E2- vermittelte Regulation der mRNA von Kollagen I und III durch die direkte Bindung beider ER als Transkriptionsfaktoren eine weitere Möglichkeit die Entwicklung der Fibrose zu modulieren. Um hier die Genexpression beider Kollagentypen präzise in den kardialen Fibroblasten zu manipulieren, bildet die Identifizierung der involvierte ER Ko- Regulatoren die Voraussetzung, um diese dann gezielt therapeutisch modifizieren zu können.

#### **3.6.4 Geschlechtsspezifische Regulation von Kollagen I und III durch 17 $\beta$ - Östradiol in gewebeähnlichen 3D- Zellkulturen aus kardialen Fibroblasten**

Mit Hilfe von 3D- Zellkulturen aus weiblichen und männlichen kardialen Rattenfibroblasten gelang es uns, die E2- vermittelte geschlechtsspezifische Regulation der mRNA von Kollagen I und III in einem gewebeähnlichen Umfeld zu bestätigen (Manuskript 2.5, [234]). Darüber hinaus konnten wir eine geschlechtsdimorphe Gewebeeigenschaft nach E2- Behandlung detektierten. Dabei beobachteten wir bei den 3D- Kulturen weiblicher Zellen eine Zunahme des Volumens durch E2, was auf eine eingeschränkte Kondensation hinwies. Dagegen zeigten die männlichen 3D- Zellkulturen eine stärkere Kondensation durch die Behandlung mit E2, welche mit einer erhöhten Steifigkeit des Gewebes verbunden war. Beschrieben ist, dass kardiale Fibroblasten sich innerhalb einer Kollagenmatrix an die Kollagenfibrillen heften, proliferieren sowie migrieren und dadurch eine Zugkraft auf das Gewebe ausüben, was dann zur Kondensation führt [248]. Basierend darauf nehmen wir an, dass es in den weiblichen 3D- Kulturen durch E2 zu einer Reduktion der Kollagen- Sekretion und somit Kondensation kommt. Im Gegensatz dazu, führt die E2- Behandlung der männlichen 3D- Kulturen zu einer erhöhten Sekretion der Kollagene und somit zu einem kompakteren Gewebe mit einer erhöhten Steifigkeit. In Betracht gezogen werden muss aber, dass der Umbau der extrazellulären Matrix einen komplexen Prozess darstellt. Zudem ist die geschlechtsspezifische Regulation [58, 83, 178, 179] und die E2- vermittelte Modulation [118, 153, 176, 177] einzelner Komponenten der extrazellulären Matrix beschrieben und es konnte in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden, dass diese ebenfalls zu den geschlechtsdimorphen Gewebeeigenschaften der 3D- Kulturen beitragen. Eine gezielte Manipulation der E2- und ER-vermittelten Regulation der Kollagene in zukünftigen Untersuchungen stellt eine Möglichkeiten der Klärung dar.

#### 4 Zusammenfassung und Ausblick

Zahlreiche Studien weisen auf Geschlechterunterschiede in den kardialen Umbauprozessen in der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie hin. Die Forschungsergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift vorgestellten Arbeiten tragen dazu bei, weitere Details zu den dafür verantwortlichen geschlechtsspezifischen molekularen Mechanismen aufzuzeigen. Außerdem gelang es mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen, die regulatorische Rolle von E2 sowie ER $\alpha$  und ER $\beta$  in beiden Geschlechtern genauer zu definieren.

Zunächst konnten wir in unseren Untersuchungen, über bereits beschriebene Mechanismen hinaus, weitere verantwortliche Signalwege zur geschlechtsdimorphen Entwicklung der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie am Tiermodell identifizieren. Weiterhin zeigten wir Unterschiede in der kardialen mitochondrialen Adaption zwischen weiblichen und männlichen Mäusen, und es gelang uns in beiden Geschlechtern die modulierende Rolle von ER $\beta$  bei der Ausprägung der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie aufzudecken. Bereits durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass sich die gezielte Aktivierung der mit dem physiologischen Wachstum des Herzens assoziierten Signalkaskaden bei verschiedenen Herzerkrankungen als protektiv erwies. Daher ist es vorstellbar, dass die Aktivierung der von uns identifizierten Mechanismen mit spezifischen, selektiven ER $\beta$ - Agonisten eine neue Strategie darstellt könnte die Entwicklung der pathologischen Myokardhypertrophie einzudämmen und die Therapie für beide Geschlechter zu verbessern. Um dies zukünftig in Betracht zu ziehen, sollte hierfür in weiterführenden Studien der verantwortliche Zelltyp im Herzen identifiziert, und die involvierten molekularen Regulationsmechanismen näher analysiert werden. Die Untersuchungen von Mäusen mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion oder Überexpression von ER $\beta$ , die eine gezielte Aktivierung von ER $\beta$  in den Zellen nachstellen, könnten dafür als nächsten Schritt in Betracht gezogen werden und weitere Details zur Rolle von ER $\beta$  in der trainingsinduzierten physiologischen Myokardhypertrophie liefern.

Zudem konnten wir mit Hilfe eines Vergleiches verschiedener Altersstufen beider Geschlechter erstmalig Unterschiede zwischen Männern und Frauen im altersbedingten Umbau der kardialen extrazellulären Matrix beschreiben. Hierbei zeigten sich mit zunehmendem Alter eine Abnahme ausgewählter extrazellulären Matrixproteine in den Herzen der Männer und ein Anstieg dieser Proteine in den weiblichen Herzen. Unsere Daten weisen durch die unveränderte Kollagenmenge im Herzen darauf hin, dass es sich bei den altersabhängigen Veränderungen der extrazellulären Matrixproteine um einen physiologischen Adaptionprozess des alternden Herzens handelt. Die nachgewiesenen geschlechtsspezifischen Umbauprozesse der extrazellulären Matrix im alternden Herzen könnten dabei eine Rolle bei den auftretenden Geschlechterunterschieden in der Pathologie

spielen. Weitere Analysen der altersbedingten Umbauprozesse im Herzen könnten dabei helfen, die Entwicklung der Herzpathologien besser zu verstehen und neue Ansatzpunkte für die Therapie zu liefern.

Außerdem konnten wir im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten belegen, dass es signifikante Geschlechterunterschiede in der Entstehung der kardialen Fibrose in Patienten mit Aortenstenose gibt. Frauen zeigen hierbei eine deutlich geringere Aktivierung profibrotischer Signalmechanismen, die mit einer verringerten Expression von fibrotischen Schlüsselregulatoren und einer geringeren Kollagenablagerung im Gewebe einhergeht. Zudem zeigen Frauen, im Vergleich zu Männern, eine schnellere post-operative Regression der Myokardhypertrophie und eine bessere Überlebensrate nach Aortenklappenersatz. Diese Ergebnisse belegen, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Anpassungsreaktion, sowohl unter Belastung als auch bei Entlastung des Herzens, gibt. In beiden Fällen spielt die kardiale Fibrose dabei eine wichtige Rolle.

Des Weiteren ist es uns gelungen, mit Hilfe von Chip- basierten Genexpressionsanalysen in intra-operativ entnommenen linksventrikuläre Biopsien der Patientinnen und Patienten mit Aortenstenose zu zeigen, dass es in den Herzen der Frauen sogar zu einer Inhibierung der Expression einzelner fibrotischer Gene sowie zu einer signifikanten Unterdrückung von Zytokin-, Chemokin- und Inflammations- assoziierten Wegen in der Pathologie kommt. Dagegen konnte wir bestätigen, dass im speziellen Fibrose- assoziierte Gene und Signalwege in den Herzen der Patienten mit Aortenstenose induziert wurden und Männer eine stärkere Prädisposition zur Entwicklung einer Fibrose aufweisen. Weiterführende Analysen sollten hierbei die geschlechtsspezifische Regulation der fibrotischen Marker näher charakterisieren.

Um ein besseres Verständnis über die verantwortlichen Mechanismen für die Geschlechterunterschiede in der kardialen Fibrose zu erlangen, untersuchten wir in diesem Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit die modulierende Rolle von E2 und den ER in der geschlechtsspezifischen Regulation von Kollagen I und III in kardialen Fibroblasten detaillierter. Dabei gelang es uns, als verantwortliche Mechanismen die E2- induzierte geschlechtsspezifische ER- Aktivierung und - Bindung an den Promotoren beider Kollagene zu identifizieren. Die aufgestellte Hypothese, dass die unterschiedliche ER- Bindung in weiblichen und männlichen kardialen Fibroblasten durch eine Rekrutierung unterschiedlicher Ko- Regulatoren begleitet wird, muss hierbei in zukünftigen Analysen getestet werden. Weiterhin nehmen wir an, dass die Mechanismen der E2- vermittelten geschlechtsspezifischen Regulation von Kollagen I und III unter anderem für die in der Klinik beobachteten Geschlechterunterschiede in der kardialen Fibrose verantwortlich sein könnten. Diese Vermutung kann durch die E2- induzierte dimorphe Regulation von Gewebeeigenschaften weiblicher und männlicher 3D- Zellkulturen untermauert werden.

Hierbei führte die E2-Behandlung weiblicher 3D- Zellkulturen zu einer eingeschränkten Kondensation, wogegen männliche 3D- Zellkulturen unter E2 stärker kondensierten und eine erhöhte Gewebefestigkeit aufwiesen. Um die beschriebenen Mechanismen und Schlüsselregulatoren zukünftig im humanen Umfeld zu testen, sollen homogen und heterogene 3D- Gewebe aus humanen weiblichen und männlichen kardialen Fibroblasten sowie Kardiomyozyten näher analysiert werden.

Zusammenfassend zeigen die präsentierten Daten in dieser Arbeit weitere Geschlechterunterschiede im Umbauprozess des Herzens auf und tragen zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bei. Basierend darauf ist das langfristige Ziel weiterführender Arbeiten pharmakologisch modulierbare Schlüsselregulatoren zu identifizieren, die eine optimalere Therapie für Mann und Frau gewährleisten.

## 5 Literatur

1. World Health Organization, *World Report on Aging and Health*. 2015.
2. Deutsche Herzstiftung, *Deutscher Herzbericht 2017*. 2017.
3. Regitz-Zagrosek, V. and G. Kararigas, *Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease*. *Physiol Rev*, 2017. **97**(1): p. 1-37.
4. Group, E.U.C.C.S., et al., *Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(1): p. 24-34.
5. Pepine, C.J., et al., *Emergence of Nonobstructive Coronary Artery Disease: A Woman's Problem and Need for Change in Definition on Angiography*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **66**(17): p. 1918-33.
6. Raparelli, V., et al., *Myocardial Infarction With No Obstructive Coronary Artery Disease: Angiographic and Clinical Insights in Patients With Premature Presentation*. *Can J Cardiol*, 2018. **34**(4): p. 468-476.
7. Mieres, J.H., et al., *Role of noninvasive testing in the clinical evaluation of women with suspected ischemic heart disease: a consensus statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2014. **130**(4): p. 350-79.
8. Cleland, J.G., et al., *The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis*. *Eur Heart J*, 2003. **24**(5): p. 442-63.
9. Lam, C.S., et al., *Sex differences in clinical characteristics and outcomes in elderly patients with heart failure and preserved ejection fraction: the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial*. *Circ Heart Fail*, 2012. **5**(5): p. 571-8.
10. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail*, 2016. **18**(8): p. 891-975.
11. Levy, D., et al., *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(18): p. 1397-402.
12. Lam, C.S.P., et al., *Mortality associated with heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a prospective international multi-ethnic cohort study*. *Eur Heart J*, 2018. **39**(20): p. 1770-1780.
13. Hill, J.A. and E.N. Olson, *Cardiac plasticity*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(13): p. 1370-80.
14. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(1): p. 38-48.
15. Obas, V. and R.S. Vasan, *The aging heart*. *Clin Sci (Lond)*, 2018. **132**(13): p. 1367-1382.
16. Meschiari, C.A., et al., *The impact of aging on cardiac extracellular matrix*. *Geroscience*, 2017. **39**(1): p. 7-18.
17. Strait, J.B. and E.G. Lakatta, *Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure*. *Heart Fail Clin*, 2012. **8**(1): p. 143-64.
18. Fajemiroye, J.O., et al., *Aging-Induced Biological Changes and Cardiovascular Diseases*. *Biomed Res Int*, 2018. **2018**: p. 7156435.
19. Frey, N., et al., *Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?* *Circulation*, 2004. **109**(13): p. 1580-9.

20. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 45-79.
21. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. *Pharmacol Ther*, 2010. **128**(1): p. 191-227.
22. Brown, R.D., et al., *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. **45**: p. 657-87.
23. Frangogiannis, N.G., *The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(5): p. 1600-1612.
24. Weber, K.T., *Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network*. *J Am Coll Cardiol*, 1989. **13**(7): p. 1637-52.
25. Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart*. *Circ Res*, 2002. **90**(5): p. 520-30.
26. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res*, 2003. **92**(8): p. 827-39.
27. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(4): p. 549-74.
28. Villari, B., et al., *Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **22**(5): p. 1477-84.
29. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1): p. 215-62.
30. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens*. *Circ Res*, 2016. **118**(6): p. 1021-40.
31. Leask, A., *Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis*. *Circ Res*, 2015. **116**(7): p. 1269-76.
32. Landry, N.M., S. Cohen, and I.M.C. Dixon, *Periostin in cardiovascular disease and development: a tale of two distinct roles*. *Basic Res Cardiol*, 2018. **113**(1): p. 1.
33. Yano, T., et al., *Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair*. *Cardiovasc Pathol*, 2005. **14**(5): p. 241-6.
34. Pichler, M., et al., *Cardiac fibrosis in human transplanted hearts is mainly driven by cells of intracardiac origin*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **59**(11): p. 1008-16.
35. Ali, S.R., et al., *Developmental heterogeneity of cardiac fibroblasts does not predict pathological proliferation and activation*. *Circ Res*, 2014. **115**(7): p. 625-35.
36. Moore-Morris, T., et al., *Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(7): p. 2921-34.
37. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. *Nat Med*, 2007. **13**(8): p. 952-61.
38. Krenning, G., E.M. Zeisberg, and R. Kalluri, *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis*. *J Cell Physiol*, 2010. **225**(3): p. 631-7.
39. Foryst-Ludwig, A. and U. Kintscher, *Sex differences in exercise-induced cardiac hypertrophy*. *Pflugers Arch*, 2013. **465**(5): p. 731-7.
40. Keller, K.M. and S.E. Howlett, *Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart*. *Can J Cardiol*, 2016. **32**(9): p. 1065-73.
41. Regitz-Zagrosek, V., *Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(5): p. 425-38.

42. Whyte, G.P., et al., *The upper limit of physiological cardiac hypertrophy in elite male and female athletes: the British experience*. Eur J Appl Physiol, 2004. **92**(4-5): p. 592-7.
43. Petersen, S.E., et al., *Functional and structural vascular remodeling in elite rowers assessed by cardiovascular magnetic resonance*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(4): p. 790-7.
44. Howden, E.J., et al., *Females have a blunted cardiovascular response to one year of intensive supervised endurance training*. J Appl Physiol (1985), 2015. **119**(1): p. 37-46.
45. Mole, P.A., *Increased contractile potential of papillary muscles from exercise-trained rat hearts*. Am J Physiol, 1978. **234**(4): p. H421-5.
46. Schaible, T.F. and J. Scheuer, *Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts*. J Appl Physiol, 1979. **46**(4): p. 854-60.
47. Schaible, T.F. and J. Scheuer, *Cardiac function in hypertrophied hearts from chronically exercised female rats*. J Appl Physiol, 1981. **50**(6): p. 1140-5.
48. Schaible, T.F., S. Penpargkul, and J. Scheuer, *Cardiac responses to exercise training in male and female rats*. J Appl Physiol, 1981. **50**(1): p. 112-7.
49. De Bono, J.P., et al., *Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **290**(4): p. R926-34.
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. Foryst-Ludwig, A., et al., *Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(1): p. H115-22.
52. Olivetti, G., et al., *Gender differences and aging: effects on the human heart*. J Am Coll Cardiol, 1995. **26**(4): p. 1068-79.
53. Loffredo, F.S., et al., *Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium*. Circ Res, 2014. **115**(1): p. 97-107.
54. Hayward, C.S., W.V. Kalnins, and R.P. Kelly, *Gender-related differences in left ventricular chamber function*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(2): p. 340-50.
55. Claessens, T.E., et al., *Noninvasive assessment of left ventricular and myocardial contractility in middle-aged men and women: disparate evolution above the age of 50?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H856-65.
56. Mendes, A.B., et al., *Quantification of left ventricular myocardial collagen system in children, young adults, and the elderly*. Medicina (B Aires), 2012. **72**(3): p. 216-20.
57. Aurigemma, G.P., et al., *Impact of chamber geometry and gender on left ventricular systolic function in patients > 60 years of age with aortic stenosis*. Am J Cardiol, 1994. **74**(8): p. 794-8.
58. Petrov, G., et al., *Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: faster in women?* Circulation, 2010. **122**(11 Suppl): p. S23-8.
59. Cramariuc, D., et al., *Sex differences in cardiovascular outcome during progression of aortic valve stenosis*. Heart, 2015. **101**(3): p. 209-14.
60. Carroll, J.D., et al., *Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly*. Circulation, 1992. **86**(4): p. 1099-107.
61. Douglas, P.S., et al., *Gender differences in left ventricle geometry and function in patients undergoing balloon dilatation of the aortic valve for isolated aortic stenosis. NHLBI Balloon Valvuloplasty Registry*. Br Heart J, 1995. **73**(6): p. 548-54.
62. Villari, B., et al., *Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload*. Eur Heart J, 1995. **16**(10): p. 1410-9.

63. Krumholz, H.M., M. Larson, and D. Levy, *Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension*. Am J Cardiol, 1993. **72**(3): p. 310-3.
64. Treibel, T.A., et al., *Reappraising myocardial fibrosis in severe aortic stenosis: an invasive and non-invasive study in 133 patients*. Eur Heart J, 2018. **39**(8): p. 699-709.
65. Varnava, A.M., et al., *Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease*. Heart, 2000. **84**(5): p. 476-82.
66. Campbell, D.J., et al., *Differences in Myocardial Structure and Coronary Microvasculature Between Men and Women With Coronary Artery Disease*. Hypertension, 2011. **57**(2): p. 186-92.
67. Ambale Venkatesh, B., et al., *Association of longitudinal changes in left ventricular structure and function with myocardial fibrosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis study*. Hypertension, 2014. **64**(3): p. 508-15.
68. Mahmoodzadeh, S., D. Fliegner, and E. Dworatzek, *Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen*. Handb Exp Pharmacol, 2012(214): p. 23-48.
69. Blenck, C.L., et al., *The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2016. **118**(8): p. 1294-312.
70. Karatas, A., et al., *Deoxycorticosterone acetate-salt mice exhibit blood pressure-independent sexual dimorphism*. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 1177-83.
71. Gurgun, D., et al., *Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 648-54.
72. Skavdahl, M., et al., *Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(2): p. H469-76.
73. Fliegner, D., et al., *Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(6): p. R1597-606.
74. Weinberg, E.O., et al., *Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(1): p. 264-73.
75. Douglas, P.S., et al., *Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(4): p. 1118-25.
76. Cavasin, M.A., et al., *Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice*. Life Sci, 2004. **75**(18): p. 2181-92.
77. Fang, L., et al., *Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(5): p. 535-44.
78. Schuster, I., et al., *Cardiomyocyte-specific overexpression of oestrogen receptor beta improves survival and cardiac function after myocardial infarction in female and male mice*. Clin Sci (Lond), 2016. **130**(5): p. 365-76.
79. Litwin, S.E., et al., *Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling*. Cardiology, 1999. **91**(3): p. 173-83.
80. Ruppert, M., et al., *Pressure-volume analysis reveals characteristic sex-related differences in cardiac function in a rat model of aortic banding-induced myocardial hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **315**(3): p. H502-H511.
81. Pfeffer, J.M., et al., *Favorable effects of therapy on cardiac performance in spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol, 1982. **242**(5): p. H776-84.

82. Gardner, J.D., G.L. Brower, and J.S. Janicki, *Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload*. J Card Fail, 2002. **8**(2): p. 101-7.
83. Witt, H., et al., *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(9): p. 1013-24.
84. Nilsson, S., K.F. Koehler, and J.A. Gustafsson, *Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(10): p. 778-92.
85. Cooke, P.S., et al., *Estrogens in Male Physiology*. Physiol Rev, 2017. **97**(3): p. 995-1043.
86. Morselli, E., et al., *The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health*. Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(6): p. 352-364.
87. Jazbutyte, V., et al., *Aromatase inhibition attenuates desflurane-induced preconditioning against acute myocardial infarction in male mouse heart in vivo*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42032.
88. Bell, J.R., et al., *Aromatase deficiency confers paradoxical postischemic cardioprotection*. Endocrinology, 2011. **152**(12): p. 4937-47.
89. Iorga, A., et al., *Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(1).
90. Grohe, C., et al., *Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis*. J Endocrinol, 1998. **156**(2): p. R1-7.
91. Malhotra, A., P. Buttrick, and J. Scheuer, *Effects of sex hormones on development of physiological and pathological cardiac hypertrophy in male and female rats*. Am J Physiol, 1990. **259**(3 Pt 2): p. H866-71.
92. Nguyen, B.T., et al., *Long-term treatment of ovariectomized mice with estradiol or phytoestrogens as a new model to study the role of estrogenic substances in the heart*. Planta Med, 2012. **78**(1): p. 6-11.
93. Kararigas, G., B.T. Nguyen, and H. Jarry, *Estrogen modulates cardiac growth through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism in healthy ovariectomized mice*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(2): p. 909-14.
94. Xu, Y., et al., *Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(2): p. 388-94.
95. Hayward, C.S., R.P. Kelly, and P. Collins, *The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(1): p. 28-49.
96. Ren, J. and R.O. Kelley, *Cardiac health in women with metabolic syndrome: clinical aspects and pathophysiology*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(6): p. 1114-23.
97. Yang, X.P. and J.F. Reckelhoff, *Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011. **20**(2): p. 133-8.
98. Mosca, L., et al., *Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the American Heart Association*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(12): p. 1404-23.
99. Carani, C., et al., *Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency*. N Engl J Med, 1997. **337**(2): p. 91-5.
100. Morishima, A., et al., *Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(12): p. 3689-98.
101. Vikan, T., et al., *Low testosterone and sex hormone-binding globulin levels and high estradiol levels are independent predictors of type 2 diabetes in men*. Eur J Endocrinol, 2010. **162**(4): p. 747-54.

102. Jankowska, E.A., et al., *Circulating estradiol and mortality in men with systolic chronic heart failure*. JAMA, 2009. **301**(18): p. 1892-901.
103. van Eickels, M., et al., *17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy*. Circulation, 2001. **104**(12): p. 1419-23.
104. Westphal, C., et al., *Effects of estrogen, an ERalpha agonist and raloxifene on pressure overload induced cardiac hypertrophy*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50802.
105. Babiker, F.A., et al., *Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1524-30.
106. Patten, R.D., et al., *17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload*. J Card Fail, 2008. **14**(3): p. 245-53.
107. Brower, G.L., J.D. Gardner, and J.S. Janicki, *Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy*. Mol Cell Biochem, 2003. **251**(1-2): p. 89-95.
108. Kolodgie, F.D., et al., *Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(9): p. 2403-14.
109. Liu, M.L., et al., *Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function*. Int J Cardiol, 2004. **97**(3): p. 485-93.
110. Booth, E.A., et al., *17Beta-estradiol as a receptor-mediated cardioprotective agent*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(1): p. 395-401.
111. Booth, E.A., et al., *The pathway-selective estrogen receptor ligand WAY-169916 reduces infarct size after myocardial ischemia and reperfusion by an estrogen receptor dependent mechanism*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **49**(6): p. 401-7.
112. Lee, T.M., et al., *Adjunctive 17beta-estradiol administration reduces infarct size by altered expression of canine myocardial connexin43 protein*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(1): p. 109-17.
113. Patten, R.D., et al., *17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling*. Circ Res, 2004. **95**(7): p. 692-9.
114. Schubert, C., et al., *Reduction of apoptosis and preservation of mitochondrial integrity under ischemia/reperfusion injury is mediated by estrogen receptor beta*. Biol Sex Differ, 2016. **7**: p. 53.
115. Gardner, J.D., et al., *Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H497-504.
116. Cavasin, M.A., et al., *Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1560-9.
117. van Eickels, M., et al., *17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(11): p. 2084-92.
118. Lee, T.M., S.Z. Lin, and N.C. Chang, *Membrane ERalpha attenuates myocardial fibrosis via RhoA/ROCK-mediated actin remodeling in ovariectomized female infarcted rats*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(1): p. 43-51.
119. Iwakura, A., et al., *Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-*

- mediated activation of matrix metalloproteinase-9.* Circulation, 2006. **113**(12): p. 1605-14.
120. Zhan, E., et al., *Dose-dependent cardiac effect of oestrogen replacement in mice post-myocardial infarction.* Exp Physiol, 2008. **93**(8): p. 982-93.
  121. Grady, D., et al., *Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II).* Jama, 2002. **288**(1): p. 49-57.
  122. Hulley, S., et al., *Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group.* JAMA, 1998. **280**(7): p. 605-13.
  123. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.* Jama, 2002. **288**(3): p. 321-33.
  124. Grodstein, F., et al., *Postmenopausal hormone therapy and cognitive function in healthy older women.* J Am Geriatr Soc, 2000. **48**(7): p. 746-52.
  125. Grodstein, F., et al., *A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease.* Ann Intern Med, 2000. **133**(12): p. 933-41.
  126. Schierbeck, L.L., et al., *Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial.* BMJ, 2012. **345**: p. e6409.
  127. Salpeter, S.R., et al., *Mortality associated with hormone replacement therapy in younger and older women: a meta-analysis.* J Gen Intern Med, 2004. **19**(7): p. 791-804.
  128. Rosano, G.M., C. Vitale, and M. Fini, *Cardiovascular aspects of menopausal hormone replacement therapy.* Climacteric, 2009. **12 Suppl 1**: p. 41-6.
  129. Schnatz, P.F., *Hormonal therapy: does it increase or decrease cardiovascular risk?* Obstet Gynecol Surv, 2006. **61**(10): p. 673-81.
  130. Haines, C.J. and E. Farrell, *Menopause management: a cardiovascular risk-based approach.* Climacteric, 2010. **13**(4): p. 328-39.
  131. Harman, S.M., *Estrogen replacement in menopausal women: recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS.* Gend Med, 2006. **3**(4): p. 254-69.
  132. Hodis, H.N., et al., *Methods and baseline cardiovascular data from the Early versus Late Intervention Trial with Estradiol testing the menopausal hormone timing hypothesis.* Menopause, 2015. **22**(4): p. 391-401.
  133. Hodis, H.N., et al., *Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol.* N Engl J Med, 2016. **374**(13): p. 1221-31.
  134. Nilsson, S., et al., *Mechanisms of estrogen action.* Physiol Rev, 2001. **81**(4): p. 1535-65.
  135. Heldring, N., et al., *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets.* Physiol Rev, 2007. **87**(3): p. 905-31.
  136. Menazza, S. and E. Murphy, *The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System.* Circ Res, 2016. **118**(6): p. 994-1007.
  137. Kato, S., et al., *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase.* Science, 1995. **270**(5241): p. 1491-4.
  138. Kousteni, S., et al., *Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids.* J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1651-64.

139. Madak-Erdogan, Z., et al., *Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(9): p. 2116-27.
140. Dworatzek, E. and S. Mahmoodzadeh, *Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system*. Pharmacol Res, 2017. **119**: p. 27-35.
141. Nordmeyer, J., et al., *Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis*. Circulation, 2004. **110**(20): p. 3270-5.
142. Mahmoodzadeh, S., et al., *Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure*. FASEB J, 2006. **20**(7): p. 926-34.
143. Dworatzek, E., et al., *Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(3): p. 418-28.
144. Irsik, D.L., P.K. Carmines, and P.H. Lane, *Classical estrogen receptors and ERalpha splice variants in the mouse*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70926.
145. Lizotte, E., et al., *Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart*. Cell Physiol Biochem, 2009. **23**(1-3): p. 75-86.
146. Pugach, E.K., et al., *Estrogen receptor profiling and activity in cardiac myocytes*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **431**: p. 62-70.
147. Lipovka, Y., et al., *Oestrogen receptors interact with the alpha-catalytic subunit of AMP-activated protein kinase*. Biosci Rep, 2015. **35**(5).
148. Grohe, C., et al., *Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors*. FEBS Lett, 1997. **416**(1): p. 107-12.
149. Huang, P.C., et al., *Anthocyanin Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiomyotoxicity via Estrogen Receptor-alpha/beta and Stabilizes HSF1 to Inhibit the IGF-IIR Apoptotic Pathway*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(9).
150. Yang, S.H., et al., *Mitochondrial localization of estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4130-5.
151. Ropero, A.B., et al., *Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(3): p. 496-510.
152. Mahmoodzadeh, S., et al., *Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-Myocardial Infarction*. J Cell Sci Ther, 2014. **5**(1): p. 153.
153. Pedram, A., et al., *Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(11): p. 2152-65.
154. Leibowitz, D., et al., *Association of an estrogen receptor-alpha gene polymorphism with left ventricular mass*. Blood Press, 2006. **15**(1): p. 45-50.
155. Peter, I., et al., *Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women*. Am J Hypertens, 2005. **18**(11): p. 1388-95.
156. Losordo, D.W., et al., *Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women*. Circulation, 1994. **89**(4): p. 1501-10.
157. Post, W.S., et al., *Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 985-91.

158. Kunnas, T., et al., *ESR1 genetic variants, haplotypes and the risk of coronary heart disease and ischemic stroke in the Finnish population: a prospective follow-up study*. *Atherosclerosis*, 2010. **211**(1): p. 200-2.
159. Schuit, S.C., et al., *Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction*. *JAMA*, 2004. **291**(24): p. 2969-77.
160. Shearman, A.M., et al., *Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts*. *Circ Res*, 2006. **98**(5): p. 590-2.
161. Shearman, A.M., et al., *Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease*. *JAMA*, 2003. **290**(17): p. 2263-70.
162. Rexrode, K.M., et al., *Polymorphisms and haplotypes of the estrogen receptor-beta gene (ESR2) and cardiovascular disease in men and women*. *Clin Chem*, 2007. **53**(10): p. 1749-56.
163. Domingues-Montanari, S., et al., *Association between ESR2 genetic variants and risk of myocardial infarction*. *Clin Chem*, 2008. **54**(7): p. 1183-9.
164. Leibetseder, V., et al., *Time dependence of estrogen receptor expression in human hearts*. *Biomed Pharmacother*, 2010. **64**(3): p. 154-9.
165. Pedram, A., et al., *Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin*. *Endocrinology*, 2008. **149**(7): p. 3361-9.
166. Babiker, F.A., et al., *Oestrogen modulates cardiac ischaemic remodelling through oestrogen receptor-specific mechanisms*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2007. **189**(1): p. 23-31.
167. Pelzer, T., et al., *Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction*. *Circulation*, 2005. **111**(12): p. 1492-8.
168. Nikolic, I., et al., *Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(4): p. 769-80.
169. Wang, M., et al., *Estrogen receptor-alpha mediates acute myocardial protection in females*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(6): p. H2204-9.
170. Jeanes, H.L., et al., *Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER)alpha agonist and unaffected by an ER beta antagonist*. *J Endocrinol*, 2008. **197**(3): p. 493-501.
171. Novotny, J.L., et al., *Rapid estrogen receptor-alpha activation improves ischemic tolerance in aged female rats through a novel protein kinase C epsilon-dependent mechanism*. *Endocrinology*, 2009. **150**(2): p. 889-96.
172. Zhai, P., et al., *Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(5): p. H1640-7.
173. Fliegner, D., et al., *Up-regulation of PPARgamma in myocardial infarction*. *Eur J Heart Fail*, 2008. **10**(1): p. 30-8.
174. Dubey, R.K., et al., *17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth*. *Hypertension*, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 522-8.
175. Zhou, L., et al., *17beta-estradiol inhibits angiotensin II-induced collagen synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts via modulating angiotensin II receptors*. *Eur J Pharmacol*, 2007. **567**(3): p. 186-92.
176. Mahmoodzadeh, S., et al., *17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts*. *Cardiovasc Res*, 2010. **85**(4): p. 719-28.
177. Queiros, A.M., et al., *Sex- and estrogen-dependent regulation of a miRNA network in the healthy and hypertrophied heart*. *Int J Cardiol*, 2013. **169**(5): p. 331-8.

178. Petrov, G., et al., *Maladaptive remodeling is associated with impaired survival in women but not in men after aortic valve replacement*. JACC Cardiovasc Imaging, 2014. **7**(11): p. 1073-80.
179. Kararigas, G., et al., *Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(11): p. 1160-7.
180. Broughton, K.M., et al., *Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration*. Circ Res, 2018. **122**(8): p. 1151-1163.
181. DeBosch, B., et al., *Akt1 is required for physiological cardiac growth*. Circulation, 2006. **113**(17): p. 2097-2104.
182. Antos, C.L., et al., *Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 907-12.
183. Haq, S., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy*. J Cell Biol, 2000. **151**(1): p. 117-30.
184. Bueno, O.F., et al., *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice*. EMBO J, 2000. **19**(23): p. 6341-50.
185. Wang, L., I. Gout, and C.G. Proud, *Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32670-7.
186. Iijima, Y., et al., *c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 23065-75.
187. Pende, M., et al., *S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(8): p. 3112-24.
188. Fulghum, K. and B.G. Hill, *Metabolic Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Remodeling*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 127.
189. Piepoli, M.F., et al., *2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)*. Eur Heart J, 2016. **37**(29): p. 2315-2381.
190. 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.
191. Weeks, K.L., et al., *Phosphoinositide 3-kinase p110alpha is a master regulator of exercise-induced cardioprotection and PI3K gene therapy rescues cardiac dysfunction*. Circ Heart Fail, 2012. **5**(4): p. 523-34.
192. McMullen, J.R. and G.L. Jennings, *Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(4): p. 255-62.
193. Ogawa, S., et al., *Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity*. Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 230-9.
194. Garey, J., et al., *Genetic contributions to generalized arousal of brain and behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 11019-22.
195. Wang, M., et al., *Estrogen receptor beta mediates increased activation of PI3K/Akt signaling and improved myocardial function in female hearts following acute ischemia*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(4): p. R972-8.

196. Vasconsuelo, A., L. Milanesi, and R. Boland, *17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. J Endocrinol, 2008. **196**(2): p. 385-97.
197. Urata, Y., et al., *17Beta-estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardiac H9c2 cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13092-102.
198. Aquila, S., et al., *Estrogen receptor (ER)alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1443-51.
199. Chen, J.Q., et al., *Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(10): p. 1540-70.
200. Stirone, C., et al., *Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(4): p. 959-65.
201. Mattingly, K.A., et al., *Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(3): p. 609-22.
202. 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.
203. Yu, H.P., et al., *Salutary effects of estrogen receptor-beta agonist on lung injury after trauma-hemorrhage*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(5): p. L1004-9.
204. Bo, H., Y. Zhang, and L.L. Ji, *Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1201**: p. 121-8.
205. Liesa, M. and O.S. Shirihai, *Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure*. Cell Metab, 2013. **17**(4): p. 491-506.
206. Dworatzek, E., I. Baczko, and G. Kararigas, *Effects of aging on cardiac extracellular matrix in men and women*. Proteomics Clin Appl, 2016. **10**(1): p. 84-91.
207. Lindsey, M.L., et al., *Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(2): p. 410-9.
208. Burgess, M.L., J.C. McCrea, and H.L. Hedrick, *Age-associated changes in cardiac matrix and integrins*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(15): p. 1739-56.
209. Lieber, S.C., et al., *Cardiac dysfunction in aging conscious rats: altered cardiac cytoskeletal proteins as a potential mechanism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H860-6.
210. Kwak, H.B., *Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart*. J Exerc Rehabil, 2013. **9**(3): p. 338-47.
211. Bradshaw, A.D., et al., *Age-dependent alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of SPARC in post-synthetic procollagen processing*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H614-22.
212. Martos, R., et al., *Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction*. Circulation, 2007. **115**(7): p. 888-95.
213. Frangogiannis, N.G., *Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease*. Physiol Rev, 2012. **92**(2): p. 635-88.
214. Upadhyya, B., et al., *Heart failure with preserved ejection fraction in the elderly: scope of the problem*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **83**: p. 73-87.

215. Kitzman, D.W., et al., *Importance of heart failure with preserved systolic function in patients > or = 65 years of age. CHS Research Group. Cardiovascular Health Study.* Am J Cardiol, 2001. **87**(4): p. 413-9.
216. Owan, T.E., et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction.* N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 251-9.
217. Barker, W.H., J.P. Mullooly, and W. Getchell, *Changing incidence and survival for heart failure in a well-defined older population, 1970-1974 and 1990-1994.* Circulation, 2006. **113**(6): p. 799-805.
218. de Jong, S., et al., *Fibrosis and cardiac arrhythmias.* J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(6): p. 630-8.
219. Chung, A.K., et al., *Women have higher left ventricular ejection fractions than men independent of differences in left ventricular volume: the Dallas Heart Study.* Circulation, 2006. **113**(12): p. 1597-604.
220. Drici, M.D., et al., *Cardiac actions of erythromycin: influence of female sex.* Jama, 1998. **280**(20): p. 1774-6.
221. Lehmann, M.H., et al., *JTc prolongation with d,l-sotalol in women versus men.* Am J Cardiol, 1999. **83**(3): p. 354-9.
222. Reinoehl, J., et al., *Probucol-associated tachyarrhythmic events and QT prolongation: importance of gender.* Am Heart J, 1996. **131**(6): p. 1184-91.
223. Rodriguez, I., et al., *Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle.* Jama, 2001. **285**(10): p. 1322-6.
224. Itoh, S., et al., *Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins.* Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 6954-67.
225. Yang, Y.C., et al., *Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10269-74.
226. Krieg, T. and E.C. LeRoy, *Diseases of the extracellular matrix.* J Mol Med (Berl), 1998. **76**(3-4): p. 224-5.
227. Mahmoodzadeh, S., et al., *17beta-Estradiol-induced interaction of ERalpha with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes.* Cardiovasc Res, 2012. **96**(3): p. 411-21.
228. Kararigas, G., et al., *Sex-specific modification of progesterone receptor expression by 17beta-oestradiol in human cardiac tissues.* Biol Sex Differ, 2010. **1**(1): p. 2.
229. Kararigas, G., et al., *Transcriptome characterization of estrogen-treated human myocardium identifies myosin regulatory light chain interacting protein as a sex-specific element influencing contractile function.* J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(4): p. 410-7.
230. Snider, P., et al., *Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin.* Circ Res, 2009. **105**(10): p. 934-47.
231. Meyer, S., et al., *Sex-specific acute heart failure phenotypes and outcomes from PROTECT.* Eur J Heart Fail, 2013. **15**(12): p. 1374-81.
232. Davis, J. and J.D. Molkentin, *Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide.* J Mol Cell Cardiol, 2014. **70**: p. 9-18.
233. Haudek, S.B., et al., *Monocytic fibroblast precursors mediate fibrosis in angiotensin-II-induced cardiac hypertrophy.* J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(3): p. 499-507.
234. Dworatzek, E., et al., *Sex-specific regulation of collagen I and III expression by 17beta-Estradiol in cardiac fibroblasts: role of estrogen receptors.* Cardiovasc Res, 2018.

- 
235. Silbiger, S., J. Lei, and J. Neugarten, *Estradiol suppresses type I collagen synthesis in mesangial cells via activation of activator protein-1*. *Kidney Int*, 1999. **55**(4): p. 1268-76.
  236. Ernst, M., C. Schmid, and E.R. Froesch, *Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(7): p. 2307-10.
  237. Irie, T., et al., *Effect of selective estrogen receptor modulator/raloxifene analogue on proliferation and collagen metabolism of tendon fibroblast*. *Connect Tissue Res*, 2010. **51**(3): p. 179-87.
  238. Corthesy, B., F.X. Claret, and W. Wahli, *Estrogen receptor level determines sex-specific in vitro transcription from the Xenopus vitellogenin promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(20): p. 7878-82.
  239. Ivanova, M.M., et al., *Sex differences in estrogen receptor subcellular location and activity in lung adenocarcinoma cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. **42**(3): p. 320-30.
  240. Lannigan, D.A., *Estrogen receptor phosphorylation*. *Steroids*, 2003. **68**(1): p. 1-9.
  241. Sanchez, M., et al., *Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation*. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. **21**(2): p. 104-10.
  242. Lam, H.M., et al., *Phosphorylation of human estrogen receptor-beta at serine 105 inhibits breast cancer cell migration and invasion*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **358**(1): p. 27-35.
  243. Powell, E. and W. Xu, *Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor alpha/beta dimers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(48): p. 19012-7.
  244. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors alpha and beta*. *Endocrinology*, 1997. **138**(3): p. 863-870.
  245. Loven, M.A., J.R. Wood, and A.M. Nardulli, *Interaction of estrogen receptors alpha and beta with estrogen response elements*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. **181**(1-2): p. 151-63.
  246. Dworatzek, E., et al., *Sex-specific regulation of collagen I and III expression by 17beta-Estradiol in cardiac fibroblasts: role of estrogen receptors*. *Cardiovasc Res*, 2019. **115**(2): p. 315-327.
  247. Pedram, A., et al., *Estrogen receptor beta signals to inhibition of cardiac fibrosis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2016. **434**: p. 57-68.
  248. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(5): p. 349-63.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Dr. hc. Regitz-Zagrosek für ihre Unterstützung der gemeinsamen wissenschaftlichen Arbeit am Institut für Geschlechterforschung in der Medizin sowie für die Sensibilisierung gegenüber dem interessanten Thema der geschlechtsspezifischen Aspekte im Bereich der Medizin bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Ingo Morano für die Möglichkeit meine Habilitation mit seiner Hilfe und Unterstützung erfolgreich zu beenden.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Privatdozentin Dr. Shokoufeh Mahmoodzadeh. Sie hat mich seit Beginn meiner wissenschaftlichen Laufbahn begleitet und stets unterstützt. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft war mir stets eine Inspiration und unsere unzähligen geführten Diskussionen haben mich wissenschaftlich maßgeblich geprägt - und Danke für das Teilen von viel Freude und Leid!

Ebenso geht mein herzlicher Dank an Frau Professor Susanne Lutz. Ihr erfahrener und unaufgeregter Blick auf die Dinge, ihre stete Ermunterung und Motivation mein Ziel zu verfolgen sowie ihre bedingungslose Unterstützung haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls danke ich Herrn Professor Wolfram-Hubertus Zimmermann für seine herzliche Unterstützung in den letzten Jahren meiner wissenschaftlichen Laufbahn. Er ist mir Beispiel dafür, dass unermüdete Leidenschaft und erfolgreiche Wissenschaft eng miteinander verbunden sind.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Geschlechterforschung in der Medizin und des Centers for Cardiovascular Research an der Charité Berlin, der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Morano am MDC in Berlin sowie am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen für ihre kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung. Ebenso gilt mein Dank all den wissbegierigen Studenten und Doktoranden, die durch ihre wissenschaftliche Begeisterung und Fleiß zum erfolgreichen Gelingen meiner wissenschaftlichen Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde. Ihr steter Glaube an mich sowie ihre Motivation und bedingungsloser Beistand waren und sind die Stütze für mich in allen Lebenslagen - ich danke Euch!

*„Wir alle leben geistig von dem, was uns Menschen in bedeutungsvollen Stunden unseres Lebens gegeben haben.“ (Albert Schweizer)*

## Eidesstattliche Erklärung

### Erklärung

#### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift