

Aus dem Institut für Geschlechtermedizin in der Forschung der
Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von Östrogen und Östrogen-Rezeptoren auf die kardiale
Mitochondrienfunktion**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Jost

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Zusammenfassung

In verschiedenen Studien zur Myokardhypertrophie (MH) wurden Geschlechterunterschiede im kardialen Energiemetabolismus nach chronischer Druckbelastung nachgewiesen. Genexpressionsanalysen konnten dabei zeigen, dass die Expression mitochondrialer Gene in den Herzen männlicher Wildtypmäuse stärker reduziert war als bei weiblichen Tieren. Die Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung einer MH könnten durch Unterschiede in der kardialen mitochondrialen Funktion männlicher und weiblicher Organismen erklärt werden und auf den Einfluss von E2 zurückzuführen sein.

Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit Geschlechterunterschiede in der kardialen oxidativen Phosphorylierung (OxPhos) und den Einfluss von 17β -Östradiol (E2) auf die mitochondriale Respiration zu untersuchen.

Dazu wurde die Studie in zwei Teilbereiche eingeteilt. In der *Ex-vivo*-Studie wurde die basale Respiration und der Einfluss von E2 auf die mitochondriale Respiration in isolierten Herzmuskelfaserpräparaten (*skinned fibers*) untersucht. In der *In-vivo*-Versuchsreihe wurden die lebenden männlichen und weiblichen Tiere mit E2 und den Östrogenrezeptoragonisten (ER-Agonisten) behandelt. Zur funktionellen Untersuchung der OxPhos wurden respirometrische Messungen mit kardialen *skinned fibers* in einem Oxygraphen durchgeführt. Der Sauerstoffverbrauch nach maximaler ADP-Stimulierung und Depletion (State-3- und State-4-Atmung) wurde mit der Clark-Elektrode erfasst und daraus der respiratorische Kontrollindex (RCI) berechnet.

In der *Ex-vivo*-Studie hatte die 2h E2-Behandlung keinen Effekt auf die mitochondriale Respiration. Jedoch führte die E2-Langzeitbehandlung der kardialen *skinned fibers* für 24h und 48h zu einer signifikant gesteigerten State-3-Atmung in beiden Geschlechtern. Auch in der *In-vivo*-Versuchsreihe zeigte sich der E2-Effekt auf die mitochondriale Respiration. Nach 5 und 24h E2-Behandlung war der Sauerstoffverbrauch in den E2 behandelten Tieren höher im Vergleich zu den Kontrollen. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Respirationsraten zu den beiden Versuchszeitpunkten können mit dem endogenen E2-Spiegel der weiblichen Tiere erklärt werden. Die *In-vivo*-Behandlung mit dem ER β -Agonisten für 5 und 24h konnte den E2-Effekt reproduzieren, wohingegen der ER α -Agonist keine vergleichbaren Effekte zeigte.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass E2 die Kapazität der OxPhos in kardialen Mitochondrien erhöht. Die Ergebnisse beider Teilbereiche der Studie lassen auf einen E2-Langzeiteffekt schließen, der über genomische

Signalwege vermittelt wird. Der ER β -Agonist konnte in beiden Geschlechtern die State-3-Atmung signifikant erhöhen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der ER β eine entscheidene Rolle in der Regulation und Vermittlung der E2-Effekte auf die kardiale OxPhos hat.

Abstract

In several studies of myocardial hypertrophy, sex differences in cardiac energy metabolism after chronic pressure overload have been shown. Expressions of mitochondrial genes in the hearts of female wild-type mice were less downregulated than in male mice. Sex differences in the development of myocardial hypertrophy were explained by differences in the cardiac mitochondrial function of the male and female organism and could be referred to the influence of 17β -oestradiol (E2).

Therefore, this study aims to investigate sex differences in cardiac oxidative phosphorylation and the influence of E2 on mitochondrial respiration. The study was divided into two parts. First, the basal respiration and the influence of E2 on mitochondrial respiration in isolated *skinned fibers* were investigated *ex vivo*. Secondly, an *in vivo*-study was performed where male and female mice were treated with E2 and oestrogen receptor agonists (ER-agonists) for 5 and 24 hours. Functional assessment of oxidative phosphorylation in cardiac *skinned fibers* was performed by respiratory measurements in an oxygraph. Oxygen consumption after maximal ADP stimulation and depletion (State-3- and State-4-respiration) was recorded by the Clark electrode and the respiration control index (RCI) was calculated.

In the *ex vivo*-study, E2 treatment for 2 hours had no effect on mitochondrial respiration, but a longer duration of treatment for 24 and 48 hours of the cardiac *skinned fibers* led to a significant increase in State-3-respiration in both sexes. The *in vivo*-study similarly showed an effect of E2 on mitochondrial respiration. After 5 and 24 hours of treatment with E2, oxygen consumption reached higher levels in the E2-treated animals compared to the controls. The sex-specific differences in respiration rates at the two different time points could be explained by the endogenous E2 of the female mice. *In vivo* treatment with ER β -agonist for 5 and 24 hours reproduced the estrogenic effects, but the ER α -agonist showed no comparable effects.

The present study shows for the first time that E2 enhances the capacity of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria. Both parts of the study suggest a long-term effect of E2 that is mediated by genomic pathways. The ER β -agonist significantly increased State-3-respiration in both sexes. In conclusion the ER β plays an important role in regulating and mediating estrogenic effects during cardiac oxidative phosphorylation.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Geschlechterunterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	1
1.2 Bedeutung von Östrogen im kardiovaskulären System.....	2
1.3 Kardialer Energiemetabolismus	4
1.4 Einfluss von E2- und ER-spezifischen Agonisten auf die oxidative Phosphorylierung	7
1.5 Ziele und Fragestellung	10
2. Material	11
2.1 Chemikalien und Fertigreagenzien	11
2.2 Geräte und Gebrauchsmaterialien	12
2.3 Herstellung der Pufferlösungen.....	13
2.3.1 KCL-Puffer.....	13
2.3.2 S-Lösung	13
2.3.3 R ₀ -Lösung	13
2.3.4 Krebs-Henseleit-Puffer	13
2.4 Herstellung der Lösungen für die <i>Ex-vivo</i> -Versuche	15
2.5 Herstellung der Lösungen für die <i>In-vivo</i> -Versuchsreihe.....	15
2.6 Herstellung der Substrate für die mitochondriale Sauerstoffmessung.....	17
3. Methoden.....	19
3.1 Tierexperimentelle Methoden.....	19
3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	19
3.2 Studiendesign	19
3.2.1 <i>Ex-vivo</i> -Experimente	21
3.2.2 <i>In-vivo</i> -Experimente.....	21
3.3 Faserpräparatherstellung – <i>Skinned-fiber</i> -Technik	22
3.3.1 Herstellung der <i>skinned fibers</i>	23
3.3.2 Aufarbeitung der <i>skinned fibers</i>	24
3.3.3 Aufbau des Oxygraphen.....	24
3.3.4 Vorbereitung der Elektroden.....	26
3.3.5 Kalibrierung der Elektroden	26
3.3.6 Durchführung der respirometrischen Messung	26

3.3.7	Respiratorischer Kontrollindex (RCI)	29
3.3.8	Substrat und Inhibierungsversuche	29
3.4	Statistik	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Basale mitochondriale Respiration.....	32
4.1.1	Die basale mitochondriale Respiration mit den Substraten Glutamat/ Malat zeigt keine geschlechtsspezifischen Unterschiede	32
4.1.2	Die basale mitochondriale Respiration mit der Fettsäure Palmitoyl- Carnitin zeigt keine Geschlechterunterschiede.....	33
4.2	<i>Ex-vivo</i> Versuche	34
4.2.1	Die E2-Langzeitbehandlung der skinned fibers für 24h und 48h erhält die mitochondriale Respiration.....	34
4.3	E2-Behandlung <i>in vivo</i>	39
4.3.1	Die E2-Behandlung <i>in vivo</i> steigert die mitochondriale Respiration in beiden Geschlechtern.....	39
4.3.2	Die <i>In-vivo</i> -Behandlung mit einem ER β -Agonisten steigert in beiden Geschlechtern die mitochondriale Respiration.....	42
4.3.3	Die <i>In-vivo</i> -Behandlung mit einem ER α -Agonisten führt nach 5h nur in den männlichen Tieren zur gesteigerten mitochondrialen Respiration	44
4.4	Morphologische Daten: Herz-und Uterusgewichte	46
5.	Diskussion.....	48
5.1	Basale mitochondriale Respiration.....	48
5.2	Einfluss von Östrogen auf die mitochondriale Respiration	50
5.3	Einfluss von ER-spezifischen Agonisten auf die mitochondriale Respiration	52
5.4	Molekulare Mechanismen der E2-Wirkung	54
5.5	Hypothetisches Modell.....	56
5.6	Schlussfolgerung	58
5.7	Methodendiskussion und Limitationen	58
5.8	Ausblick	60
	Literaturverzeichnis	61
	Eidesstattliche Versicherung	68
	Lebenslauf.....	69
	Publikationen.....	70
	Danksagung	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der humanen Östrogenrezeptoren ER α und ER β . ²³	2
Abbildung 2: Multiple Signalwege von Östrogen in kardialen Zellen. ⁵	3
Abbildung 3: Darstellung der Substratwege im kardialen Energiemetabolismus. ³⁴	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung. ³⁹	7
Abbildung 5: Darstellung der chemischen Strukturformeln der ER α -Agonisten 16 α -LE ₂ und PPT und der ER β -Agonisten 8 β -VE ₂ und DPN.	9
Abbildung 6: Studiendesign der <i>Ex-vivo</i> -Versuchsreihe.	20
Abbildung 7: Studiendesign der <i>In-vivo</i> -Versuchsreihe.....	20
Abbildung 8: Prinzip der selektiven Plasmamembran-Permeabilisation. ⁵⁵	23
Abbildung 9: Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der Faserung am Beispiel des Musculus solei aus Ratte. ⁵⁵	24
Abbildung 10: Oxygraph-Messeinheit mit Messkammer und eingesetzter Clark-Typ-Elektrode (Hansatech-Instruments).	25
Abbildung 11: Darstellung der Reaktionen an der Clark-Elektrode. ⁵⁶	25
Abbildung 12: Aufzeichnung einer typischen Oxygraphmessung für kardiale <i>skinned fibers</i> aus gesundem Mausgewebe.	28
Abbildung 13: Darstellung der Substrat- und Inhibierungsstudien. ⁵⁵	30
Abbildung 14: Darstellung der basalen mitochondrialen Respiration in unbehandelten männlichen und weiblichen Tieren.	32
Abbildung 15: Darstellung der mitochondrialen Respiration mit den Substraten Glutamat/Malat im Vergleich zu Palmitoyl-Carnitin in männlichen Tieren.	33
Abbildung 16: Darstellung der mitochondrialen Respiration mit den Substraten Glutamat/Malat im Vergleich zu Palmitoyl-Carnitin in weiblichen Tieren.	34
Abbildung 17: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 2h E2-Behandlung <i>ex vivo</i> der kardialen <i>skinned fibers</i> im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.	35
Abbildung 18: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h E2-Behandlung <i>ex vivo</i> der kardialen <i>skinned fibers</i> im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.	36
Abbildung 19: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 48h E2-Behandlung <i>ex vivo</i> der kardialen <i>skinned fibers</i> im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.	37
Abbildung 20: Darstellung der basalen mitochondrialen Respiration in Skelettmuskelfasern aus unbehandelten männlichen und weiblichen Tieren.	38

Abbildung 21: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h <i>Ex-vivo</i> -E2-Behandlung der Skelettmuskelfasern im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.	39
Abbildung 22: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 5h E2-Behandlung <i>in vivo</i> im Vergleich zu den mit Dextrin behandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.	40
Abbildung 23: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h E2-Behandlung <i>in vivo</i> im Vergleich zu den mit Dextrin behandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.	41
Abbildung 24: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 5h <i>In-vivo</i> -Behandlung mit Compound A (links) und Compound E (rechts) in männlichen und weiblichen Tieren.	42
Abbildung 25: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h <i>In-vivo</i> -Behandlung mit Compound A in männlichen und weiblichen Tieren.	43
Abbildung 26: Darstellung der mitochondrialen Respiration in Skelettmuskelfasern nach 24h <i>In-vivo</i> -Compound-A-Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.	44
Abbildung 27: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 5h <i>In-vivo</i> -PPT-Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.	45
Abbildung 28: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h <i>In-vivo</i> -PPT-Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.	45
Abbildung 29: Darstellung der mitochondrialen Respiration in Skelettmuskelfasern nach 5h und 24h <i>In-vivo</i> -PPT- Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.	46
Abbildung 30: Hypothetisches Modell zur Wirkungsweise von E2/ER auf die kardiale mitochondriale Respiration.	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Fertigreagenzien.....	11
Tabelle 2:	Übersicht über die verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 3:	Puffer und Lösungen.....	14
Tabelle 4:	Anzahl der Tiere und Gruppenzusammensetzung für die <i>Ex-vivo</i> -Experimente.....	21
Tabelle 5:	Übersicht über die 5h <i>In-Vivo</i> -Behandlungen mit E2, ER β -und ER α -Agonist.....	22
Tabelle 6:	Übersicht über die 24h <i>In-Vivo</i> -Behandlungen mit E2, ER β -und ER α -Agonist.....	22
Tabelle 7:	Übersicht über die Herzgewichte nach 5h Behandlung.....	47
Tabelle 8 :	Übersicht über die Uterusgewichte nach 5h Behandlung.....	47

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
COX	Cytochrom C-Oxidase
Cyt C	Cytochrom C
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPN	2,3- <i>bis</i> (4-Hydroxyphenyl)-propionitrile
DTT	Dithiothreitol
E2	17 β -Östradiol
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether) - <i>N, N, N', N'</i> -tetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptoren
ERE	Östrogen Responsive Elemente
ER α	Östrogenrezeptor Alpha
ER β	Östrogenrezeptor Beta
EtOH	Ethanol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKE	Herzkreislauferkrankungen
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino) ethansulfonsäure
MH	Myokardhypertrophie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mtDNA	Mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
mV	Millivolt
OxPhos	oxidative Phosphorylierung
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEG	Polyethylenglykol
PPT	4,4',4''-(4-Propyl-[1 <i>H</i>]-pyrazole-1,3,5-triyl) <i>tris</i> phenol
RCI	Respiratorischer Kontrollindex
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TG	Trockengewicht
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Geschlechterunterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen

Herzkreislauferkrankungen (HKE) sind weltweit die häufigste Todesursache bei Männern und Frauen.¹ Allerdings bestehen bei HKE gravierende Unterschiede zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht. Wesentliche Unterschiede liegen in Entwicklung, klinischem Erscheinungsbild und Alter bei Manifestation der Krankheit.²⁻⁴ Frauen entwickeln HKE durchschnittlich 10-20 Jahre später als Männer. HKE bei prämenopausalen Frauen verlaufen jedoch mit einer ungünstigeren klinischen Prognose.⁵

Bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen entwickelt sich eine Myokardhypertrophie (MH). Die Anpassungsreaktionen nach Druckbelastung sind bei beiden Geschlechtern unterschiedlich.^{6,7} Frauen entwickeln eher eine konzentrische Form der MH mit erhaltener systolischer Funktion, Männer eher eine exzentrische Form, die zum Verlust der linksventrikulären Funktion und häufig zur Herzinsuffizienz (HF) führt.⁸ Diese Geschlechterunterschiede bei MH konnten in zahlreichen tierexperimentellen Studien bestätigt werden.⁹⁻¹² Schon seit längerem wird die Frage, ob diese klinisch manifestierten Unterschiede auf den Einfluss von Sexualhormonen, insbesondere Östrogen, zurückzuführen sind, experimentell untersucht.

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz geht mit einer Dysregulation der mitochondrialen Atmungskette von Kardiomyozyten einher, was zu einer unzureichenden ATP-Versorgung der Myozyten und einer verstärkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt.¹³ Somit spielen Veränderungen in der kardialen Mitochondrienfunktion eine wesentliche Rolle in der Pathologie der HF.

Tierexperimentelle Studien zur Genexpression bei drucklastinduzierter MH lieferten einen Hinweis darauf, dass Östrogen die mitochondriale Funktion und den Energiemetabolismus beeinflussen kann.^{12,14,15} Gene des kardialen Stoffwechsels waren in beiden Geschlechtern bei MH vermindert exprimiert. Jedoch war die Reduktion der Expression in weiblichen Tieren weniger stark ausgeprägt als in männlichen Tieren.¹²

Dies könnte auf einen besseren Erhalt des kardialen Stoffwechsels und der Mitochondrienfunktion in den weiblichen Tieren hinweisen.

1.2 Bedeutung von Östrogen im kardiovaskulären System

In diesem Abschnitt werden die bislang bekannten Effekte von Östrogen im kardiovaskulären System und die Rolle der Östrogenrezeptoren beschrieben.

Die natürlich vorkommenden Östrogene im Menschen, 17 β -Estradiol (E2), Estron (E1) und Estriol (E3), gehören zur Gruppe der Steroidhormone.¹⁶

E2 ist die vornehmlich biologisch aktive und im Blut von Frauen und Männern zirkulierende Form des Östrogens. E2 wird in den Granulosazellen der Ovarien und den Leydigzellen der Testes synthetisiert. Das Enzym Aromatase katalysiert die Umwandlung des direkten Vorläuferhormons Testosteron zu E2. Neben der gonadalen Synthese wird E2 in Fett-, Leber-, Muskel- und Gehirnzellen gebildet, allerdings hat nur die Synthese im Fettgewebe einen signifikanten Anteil an dem im Blut zirkulierenden E2. Die Serumkonzentration von E2 liegt bei Männern deutlich unter der von prämenopausalen Frauen (Männer: 73-184 pmol/L; prämenopausale Frauen: 280-1285 pmol/L), postmenopausal sinkt die E2-Konzentration auf jene gleichaltriger Männer ab.^{16,17}

Die E2-Effekte werden u.a. durch die beiden Östrogenrezeptoren (ER) alpha (ER α) und beta (ER β) vermittelt. ER α und ER β gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Genexpression verändern können.^{21,22} Abbildung 1 zeigt den strukturellen Aufbau der beiden ER.

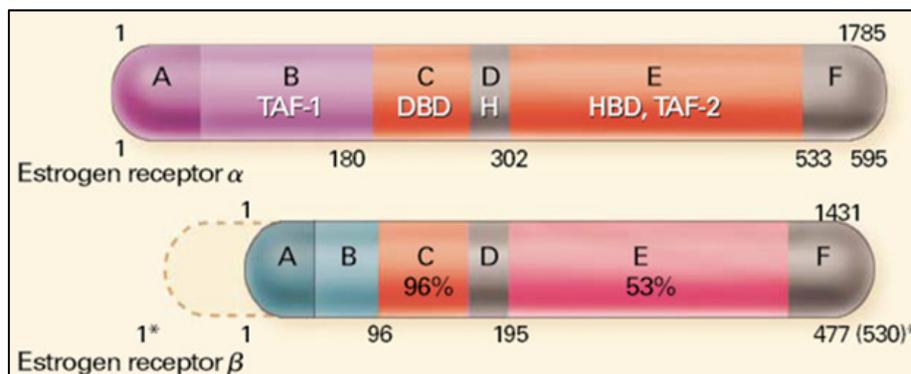


Abbildung 1: Struktur der humanen Östrogenrezeptoren ER α und ER β .²³

Wie alle Steroidhormonrezeptoren bestehen die ER aus sechs verschiedenen Domänen A-F. Die N-terminale AB-Domäne enthält die ligandenunabhängige transkriptionelle Aktivierungsfunktion (TAF-1). Diese ist in beiden ER unterschiedlich aufgebaut.

Die C-Region beinhaltet die DNA-bindende Domäne (DBD). Die DBD enthält zwei Zinkfinger, die der Dimerisierung des Rezeptors und anschließenden DNA-Bindung dienen. Die D-Domäne ist die Hinge(H)-Region des Rezeptors. In der E-Domäne sind die hormonbindende Domäne (HBD) und die hormonabhängige transkriptionelle Aktivierungsfunktion (TAF-2) enthalten.²³

Die F-Domäne zeigt eine hohe Variabilität und ist für die unterschiedliche Antwort der Östrogenrezeptoren auf Östrogen und die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) verantwortlich.²⁴ Die stärksten Homologien zwischen ER α und ER β finden sich in der DNA-bindenden Domäne (96 %) und in der hormonbindenden Domäne (53 %).

Es sind verschiedene Signalwege für Östrogen in kardialen Zellen beschrieben (Abbildung 2).^{23,25}

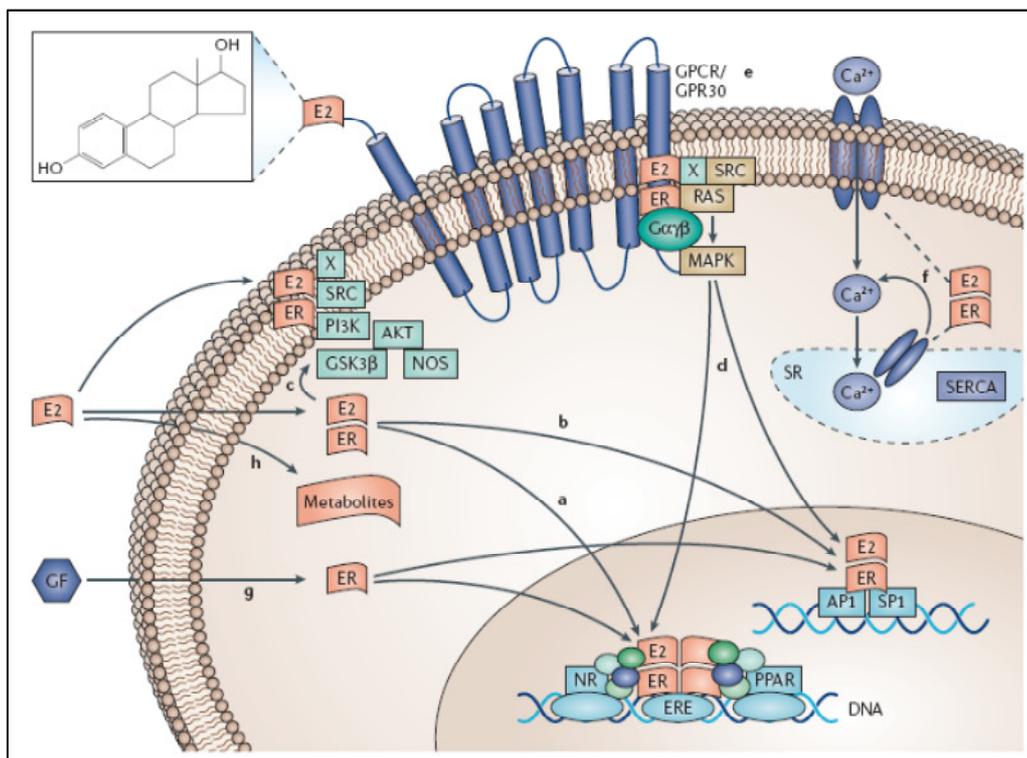


Abbildung 2: Multiple Signalwege von Östrogen in kardialen Zellen.⁵

Nach Aktivierung des zytosolischen ER durch E2 wird der E2/ER-Komplex in den Nucleus transloziert und bindet dort als Hetero- oder Homodimer an östrogen-responsive Elemente (ERE) der DNA, um die Transkription diverser Gene zu beeinflussen. Der E2/ER-Komplex kann mit anderen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, Ko-Aktivatoren, interagieren und auf diese Weise die

Transkription bestimmter Gene modulieren.^{26,27} Ko-Aktivatoren können Proteine des Transkriptionsapparates rekrutieren und erfüllen enzymatische Funktionen. Die Interaktion des ER mit Ko-Repressoren kann die Transkription bestimmter Zielgene verhindern.²³

Neben der Einflussnahme auf genomischer Ebene kann E2 an membranassoziierte ER binden und zytosolische Signalkaskaden aktivieren. Der membrangebundene E2/ER-Komplex führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase SRC, welche die NOS-Signalkaskade und die MAPK-Signalkaskade aktivieren kann. Die NOS-Signalkaskade führt über die Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), AKT und Glykogensynthasekinase (GSK3 β) über die Stimulierung der NO-Synthase zur Produktion von NO, welches in isolierten Arterien eine Vasodilatation zur Folge hat.²⁸ E2 kann seine Wirkung auch über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor GPR30 vermitteln und induziert dabei den MAPK-Signaltransduktionsweg.²⁹ Ein weiterer direkter E2-Effekt konnte in isolierten Kardiomyozyten aus Rattenherzen gezeigt werden. E2 führt konzentrationsabhängig zu einem Anstieg des Ca²⁺-Einstromes über spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle in kardialen Myozyten.³⁰

Zum einen können ER unabhängig von E2 durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden.^{31,32} Zum anderen können Östrogenmetabolite wie Catechol-Östradiol oder Methoxy-Östradiol E2-Effekte rezeptorunabhängig vermitteln. Sie verhindern unter anderem die Proliferation und Migration von kardialen Fibroblasten und verbessern die endotheliale Gefäßfunktion.³³

Grohe et al. konnten erstmals die Funktionalität der beiden ER in Kardiomyozyten und Fibroblasten aus Rattenherzen nachweisen.¹⁸ In humanem Herzgewebe sind die ER in Zytoplasma und Nukleus der Kardiomyozyten lokalisiert.^{19,20} Darüber hinaus zeigten die Autoren eine Zunahme der ER α - und ER β -Expression in Patienten mit Aortenstenose und dilatativer Kardiomyopathie. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Herz als wichtiges Zielorgan der Östrogene fungiert und verdeutlichen die Bedeutung der ER in der Vermittlung der E2-Effekte.

1.3 Kardialer Energiemetabolismus

Das Herz hat einen hohen Energiebedarf, um zelluläre Prozesse wie Ionentransport, Sarkomerfunktion oder intrazelluläre Ca²⁺ Homöostase,

aufrechtzuerhalten. Die an der ATP-Produktion beteiligten Substratwege müssen fortwährend an die Veränderungen im Energiebedarf und in der Substratbereitstellung angepasst werden, da kardiales Gewebe eine geringe Speicherkapazität besitzt.¹⁶ Im gesunden adulten Herzen führt unter ausreichender Sauerstoffversorgung hauptsächlich die Oxidation von Fettsäuren und Glukose zur ATP-Produktion (Abbildung 3).

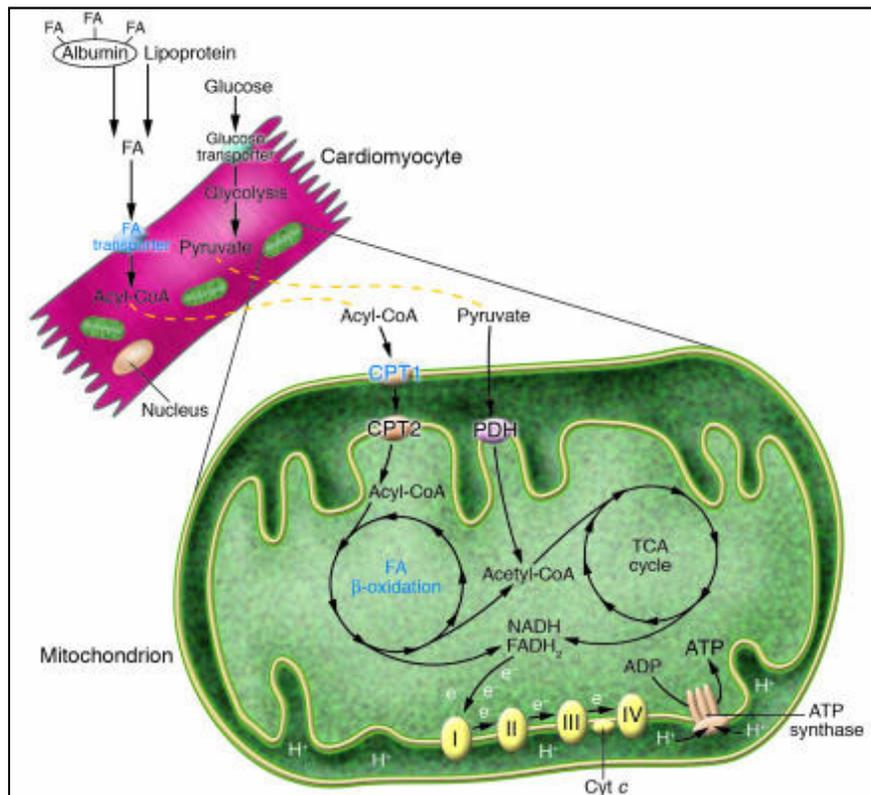


Abbildung 3: Darstellung der Substratwege im kardialen Energiemetabolismus.³⁴

Die Oxidationen von Fettsäuren (FA) und Glukose sind die wesentlichen Substratwege für die ATP-Synthese im adulten Herzen. Das aus der Fettsäure- und Glukoseoxidation entstehende Acetyl-CoA wird im Tricarbonsäurezyklus (TCA) weiter oxidiert. Dabei werden die Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ gebildet, die in der Atmungskette oxidiert werden und zur ATP-Synthese führen. **CPT1/2** = Carnitoyl-Palmitoyl-Transferase 1/2; **PDH** = Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex.

Zirkulierende, langkettige, freie Fettsäuren haben mit 60-90 % den größten Anteil an der kardialen ATP-Synthese; 10-40 % des produzierten ATP wird über die Glukoseoxidation gewonnen.^{35,36} Nach der β-Oxidation der Fettsäuren und der Oxidation von Pyruvat durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) entsteht in beiden Substratwegen Acetyl-CoA, das im Tricarbonsäurezyklus (TCA) oxidiert wird. Die in der β-Oxidation und im TCA gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ werden in der Atmungskette reoxidiert. Dabei wird ein elektrochemischer Gradient geschaffen, der in Anwesenheit von Sauerstoff zur ATP-Synthese führt.

Diese chemische Reaktion wird als oxidative Phosphorylierung (OxPhos) bezeichnet; sie findet in den Mitochondrien der Zellen statt.³⁷

Mitochondrien, intrazelluläre Organellen von etwa 2 µm Länge, die in unterschiedlicher Anzahl in allen eukaryotischen Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten vorkommen, sind die Orte der zellulären Energiegewinnung durch ATP-Synthese. Die Mitochondrien werden von zwei Membranen gebildet, die verschiedene Kompartimente beinhalten. Im Inneren der Mitochondrien, der mitochondrialen Matrix, erfolgt die Endoxidation der Nahrungsmetabolite. Die Enzyme des TCA und der β-Oxidation sind dort lokalisiert. Die stark gefaltete innere Mitochondrienmembran enthält die Multienzymkomplexe der Atmungskette. In dem zwischen Innen- und Außenmembran lokalisierten Intermembranraum befinden sich zwei wichtige Proteinkomplexe der OxPhos: das Elektronen übertragende Enzym Cytochrom C und die Adenylatkinase, die die Synthese von ADP aus AMP katalysiert.³⁸

Die zur ATP-Synthese erforderliche Energie entstammt formal der Knallgasreaktion:



Der beim Endabbau von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fetten freigesetzte Wasserstoff wird in Form von Reduktionsäquivalenten als NADH und FADH₂ zwischengespeichert. Die Reduktionsäquivalente werden an den Komplexen der Atmungskette reoxidiert und die Elektronen schrittweise auf den Sauerstoff übertragen (Abbildung 4).

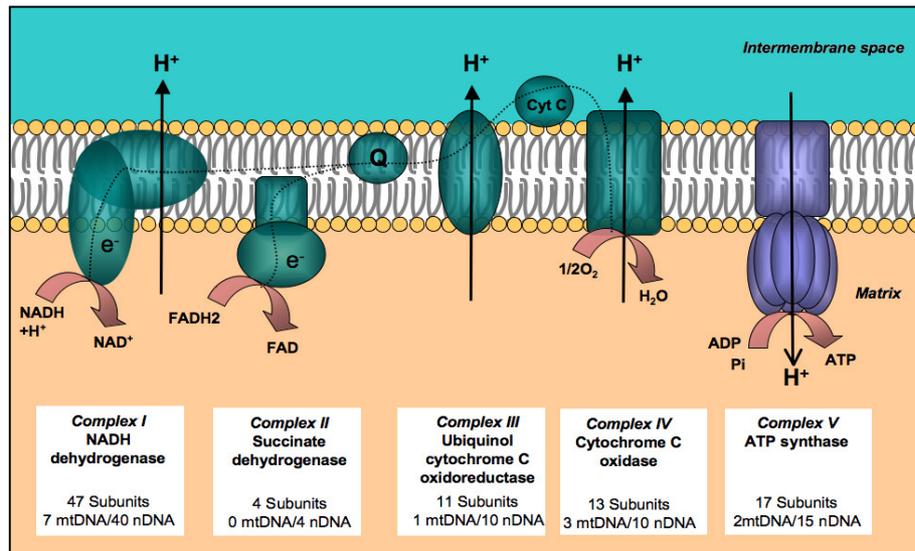


Abbildung 4: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung.³⁹

Die Atmungskette besteht aus vier Multienzymkomplexen (Komplex I-IV) und zwei mobilen Substraten, dem Ubichinon (Coenzym Q) und dem Cytochrom C, die die Elektronen zwischen den Komplexen übertragen. Die im Intermediärstoffwechsel entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ werden zuerst am Komplex I bzw. am Komplex II oxidiert und die Elektronen zum Ubichinon transportiert. Die Elektronen werden über den Komplex III auf Cytochrom C und von dort über den Komplex IV auf den Sauerstoff übertragen, wobei sie diesen unter H₂O-Bildung reduzieren. Die Komplexe I, III und IV bauen durch die Translokation von Protonen vom Matrixraum in den Intermembranraum einen elektrochemischen Gradienten auf, den die F₁/F₀-ATP-Synthase für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischen Phosphat nutzt.

Der Elektronentransport über die Komplexe I, III und IV geht mit einem Protonentransport aus dem Matrixraum in den Intermembranraum einher. In dem aufgebauten Protonengradienten wird die bei der Reoxidation der Reduktionsäquivalente frei werdende Energie zwischengespeichert und von der F₁/F₀-ATP-Synthase zur ATP-Synthese genutzt.^{39,40}

1.4 Einfluss von E2- und ER-spezifischen Agonisten auf die oxidative Phosphorylierung

E2 kann unterschiedliche Effekte auf die mitochondriale Funktion in verschiedenen Geweben ausüben.

Zunächst wurden E2-Bindungsstellen in den Mitochondrien unter anderem an der F₀/F₁-ATPase gefunden.^{41,42} Darüber hinaus konnten beide ER in den Mitochondrien zahlreicher Gewebe und Zelllinien nachgewiesen werden.⁴³⁻⁴⁵ Yang et al. gelang der Nachweis der Lokalisation von ERβ in humanen Kardiomyozyten.⁴⁶

ERE wurden in der Regulationsregion der mitochondrialen DNA (mtDNA) identifiziert, was die Vorstellung, dass ligandengebundene ER die Transkription mitochondrialer DNA beeinflussen können, unterstützt.⁴⁷ Chen et al. konnten zeigen, dass E2 die Expression von ER α und ER β in den Mitochondrien von MCF7-Zellen steigert und die Transkription mitochondrialer Gene, die für die Cytochrom-C-Oxidase (COX)-Untereinheiten I und II kodieren, erhöht.⁴⁸ Des Weiteren wird die Transkription nukleär kodierter Proteine der mitochondrialen Atmungskette, wie die Untereinheit E der ATP-Synthase, durch E2 induziert.⁴⁹

Stirone et al. konnten in einer Studie an weiblichen ovariectomierten Ratten zeigen, dass eine E2-Behandlung *in vivo* die Kapazität der OxPhos in isolierten Mitochondrien aus zerebralen Gefäßen steigert. Die E2-Behandlung führte sowohl zu einer signifikant erhöhten Expression von Untereinheiten des Komplex IV der Atmungskette als auch zur Erhöhung der Aktivität des Komplex IV und der Citrat-Synthase, zweier wesentlicher Enzyme der OxPhos.⁵⁰

Zur gewebespezifischen Untersuchung der E2-Wirkungen im Tierversuch wurden hochselektive Agonisten für ER α und ER β entwickelt. Es werden steroidale Liganden, wie der ER α -Agonist 16 α -Lactone-Estradiol (16 α -LE₂) und der ER β -Agonist 8 β -Vinyl Estradiol (8 β -VE₂), von neueren nicht-steroidalen Liganden, wie 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (ER α -Agonist PPT) und 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (ER β -Agonist DPN), unterschieden (Abbildung 5).

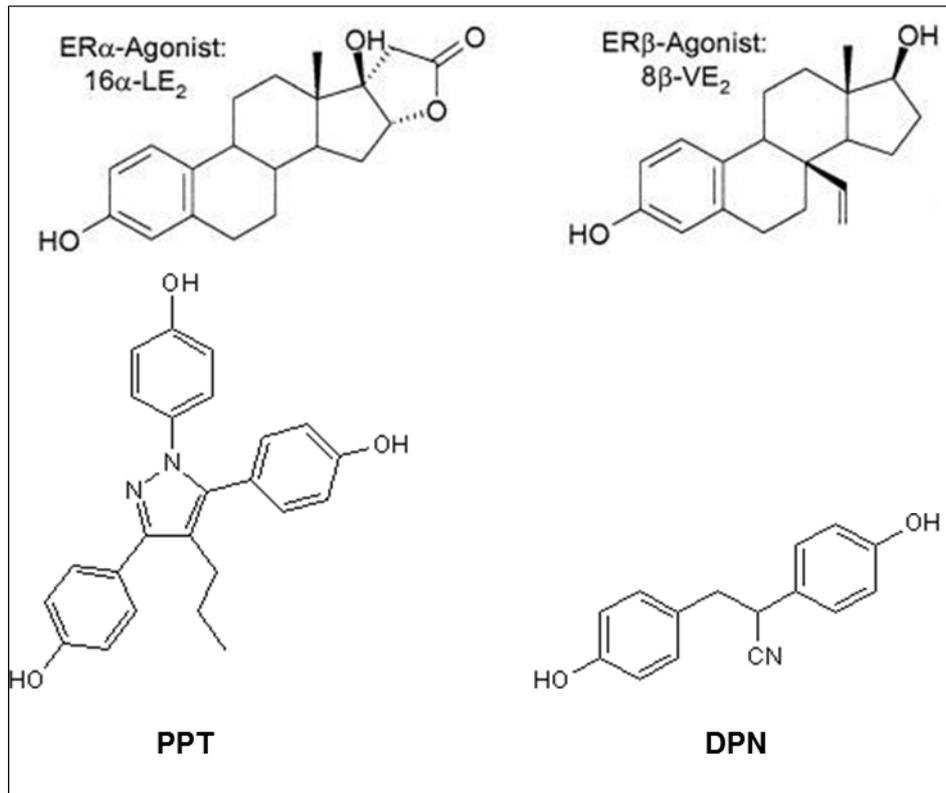


Abbildung 5: Darstellung der chemischen Strukturformeln der ER α -Agonisten 16 α -LE₂ und PPT und der ER β -Agonisten 8 β -VE₂ und DPN.

Chen et al. zeigten in humanen Brustepithelzellen, dass eine E2-Behandlung die Expression mitochondrial kodierter Gene der Atmungskette erhöht. Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit dem ER β -spezifischen Agonisten DPN reproduziert werden.⁵¹

Bisher ist der Einfluss von E2 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, der mit der Aktivität der OxPhos korreliert, nur wenig beschrieben. Lediglich für isolierte Mitochondrien aus den Gehirnen ovariectomierter Ratten ermittelten verschiedene Autoren nach *In-vivo*-Behandlung mit E2 einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der State-3-Atmung und einen erhöhten respiratorischen Kontrollindex.^{52,53} Dieser zeigt die Kopplung von Atmungskette und OxPhos an und erlaubt daher eine Aussage über die Funktionsfähigkeit isolierter Mitochondrien

1.5 Ziele und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, Geschlechterunterschiede in der mitochondrialen Atmung und die Rolle von E2 auf die OxPhos in linksventrikulären Herzmuskelfaserpräparaten (*skinned fibers*) aus Wildtypmäusen zu untersuchen.

Der erste Teil der Studie hatte zum Ziel, die basale Respiration in *skinned fibers* aus männlichen und weiblichen Tieren zu erfassen und den Einfluss von E2 *ex vivo* auf die mitochondriale Respiration zu untersuchen.

Dabei standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

1. Finden sich Geschlechterunterschiede in der basalen mitochondrialen Respiration?
2. Hat eine E2-Behandlung in *skinned fibers* einen Einfluss auf die mitochondriale Respiration *ex vivo*?

E2-Effekte auf die OxPhos in kardialen Mitochondrien im *Ex-vivo*-Modell ziehen eine Prüfung und Verifizierung *in vivo* nach sich. Hierbei wird gesunden Wildtypmäusen eine physiologische E2-Injektion verabreicht. Lässt sich der *ex vivo* gemessene E2-Effekt auf die mitochondriale Respiration auch *in vivo* eruieren, soll analysiert werden, ob und über welchen ER dieser vermittelt wird.

Mit dem in Anschluss durchgeführten *In-vivo*-Modell sollten folgende Fragen erörtert werden:

1. Kann eine *In-vivo*-E2-Behandlung die mitochondriale Respiration der *skinned fibers* erhöhen?
2. Lassen sich Geschlechterunterschiede in den Respirationsraten nach einer E2-Gabe *in vivo* feststellen?
3. Werden E2-Effekte auf die OxPhos über ER α und/oder ER β vermittelt?

2. Material

2.1 Chemikalien und Fertigreagenzien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Fertigreagenzien.

Substanz	Firma
ADP	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Albumin bovine serum fatty acid free (BSA)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
17 β -Östradiol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
2,3 Butanedione monoxime	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
CaCO ₃	Carl Roth (Karsruhe, Deutschland)
CaCl ₂	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Cytochrom C	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Dithiothreitol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
DMSO	Carl Roth (Karsruhe, Deutschland)
EGTA	Fluka/ Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
HEPES	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Imidazol	Fluka/ Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
KCl	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
K ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
KH ₂ PO ₄	Carl Roth (Karsruhe, Deutschland)
KOH	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
L-Glutamate acid sodium salt	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
L-Malat Acid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
MgCl ₂	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
MgSO ₄	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Mg-Acetat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Methansulfonsäure	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Na ₂ ATP	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Na-Azid (NaN ₃)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
NaCl	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Substanz	Firma
Na-Succinat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
NaHCO ₃	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
NaH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Oligomycin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Palmitoyl- DL-Carnitin-Chlorid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Phosphocreatine Na ₂ H ₂ O	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Rotenon	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Saponin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Sodium dithionite	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Taurin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

2.2 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien.

Geräte/Gebrauchsmaterialien	Firma
Oxygraph	Hansatech Instruments (England)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortexer	IKA-Werke (Staufen, Deutschland)
Mehrstellenmagnetrührer POLY 15	Carl Roth (Karsruhe, Deutschland)
Wärmeschrank	GFL 3033 (Burgwedel, Deutschland)
pH- Meter	Mettler- Toledo (Gießen, Deutschland)
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Falconröhrchen	BD Bioscience (NJ, USA)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kunststoffpipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.3 Herstellung der Pufferlösungen

2.3.1 KCL-Puffer

Der KCl-Puffer diente als Messlösung für die respirometrischen Messungen der *skinned fibers* im Oxygraphen und wurde aus den in Tabelle 3 aufgelisteten Substanzen hergestellt. Der KCl-Puffer wurde mit Aqua bidestillata (ddH₂O) auf 200 ml aufgefüllt. Mithilfe des pH-Meters wurde der pH-Wert durch Zugabe von 3 M KOH-Lösung auf den Wert 7,1 eingestellt. Die Pufferlösung wurde bei 4 ° C gelagert. Vor Beginn der Messung wurden zur Messlösung 2 mg BSA/ml KCl-Puffer sowie die Substrate Glutamat (5 mM Glutamat/ml KCl-Puffer) und Malat (2 mM Malat/ml KCl-Puffer) hinzugefügt.

2.3.2 S-Lösung

Die Lösung zur Permeabilisierung der Muskelfasern bestand aus den in Tabelle 3 aufgeführten Substanzen. Die Lösung wurde mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit einer 3 M KOH-Lösung auf pH 7,1 eingestellt. Danach wurde die S-Lösung zu je 50 ml aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Zur Permeabilisierung der Muskelfasern wurde der S-Lösung am jeweiligen Versuchstag Saponin zugefügt. Dazu wurden 2,5 mg Saponin in 1 ml Aqua dest. gelöst. Von dem in Wasser gelösten Saponin wurden 60 µl in 2940 µl S-Lösung pipettiert.

2.3.3 R₀-Lösung

In gleicher Weise wurde die R₀-Lösung mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Substanzen hergestellt. Aus der R₀-Lösung wurde am jeweiligen Versuchstag die R-Lösung hergestellt, die für Waschschriffe nach Permeabilisierung der Muskelfasern verwendet wurde. Dazu wurden der R₀-Lösung 2 mg BSA/ml und die Substrate Glutamat (5 mM/ml) und Malat (2 mM/ml) hinzugefügt.

2.3.4 Krebs-Henseleit-Puffer

Der Krebs-Henseleit-Puffer diente als Storagepuffer nach Organentnahme. Zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers wurden die in der Tabelle 3 aufgeführten Substanzen eingewogen und in 1 l ddH₂O gelöst. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch des Puffers wurde dieser mit Carbogen oxygeniert, damit das Herzgewebe vor Permeabilisierung der Fasern nicht ischämisch wurde.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge
KCl-Respirationspuffer	3 M KCl	8,3 ml
	Hepes	953 mg
	Mg-Acetat	128 mg
	EGTA	30 mg
	100 mM KH_2PO_4	10 ml
	10 mM DTT	6 ml
	ddH ₂ O	ad 200 ml
S-Lösung	100 mM Ca_2EGTA	13,85 ml
	100 mM K_2EGTA	36,15 ml
	500 mM MgCl_2	6,56 ml
	50 mM Na_2ATP	57 ml
	100 mM Creatinphosphat	75 ml
	1 M Imidazol	10 ml
	1 M Taurin	10 ml
	10 mM DTT	25 ml
	1 M K-Mes	25 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml	
R ₀ -Lösung	100 mM Ca_2KEGTA	13,85 ml
	100 mM K_2EGTA	36,15 ml
	500 mM MgCl_2	1,38 ml
	1 M K_2HPO_4	1,5 ml
	1 M Imidazol	10 ml
	1 M Taurin	10 ml
	10 mM DTT	25 ml
	1 M K-MES	45 ml
	1 M Na-MES	5 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml	
Krebs-Henseleit-Puffer	NaCl	6,9 g
	KCl	350 mg
	MgSO_4	296 mg
	KH_2PO_4	163 mg
	NaHCO_3	2,1 g
	ddH ₂ O	ad 1000 ml

2.4 Herstellung der Lösungen für die *Ex-vivo*-Versuche

E2-Stammlösung

Für die Behandlung der *skinned fibers* wurde ein wasserlösliches β -Östradiol verwendet. Zur Herstellung einer 10^{-2} M E2-Stammlösung müssten bei einem Molekulargewicht von 272,38 g/mol 2,7238 mg in 1 ml ddH₂O gelöst werden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass in 1 g E2 (Dextrin encapsuled) nur 4,76 % reines E2 enthalten ist, sodass für eine 10^{-2} M Lösung 57,14 mg des in Dextrin eingehüllten E2 in 1 ml Aqua purificata gelöst wurde.

Für die Behandlung der *skinned fibers* wurde eine physiologische E2-Konzentration von 10^{-8} mol/l in R-Lösung verwendet. Dazu wurde die zuvor hergestellte E2-Stammlösung mit einer Konzentration von 10^{-2} mol/l dreimal nacheinander mit R-Lösung 1:100 verdünnt. Zu 990 μ l R-Lösung wurden 10 μ l aus der 10^{-2} M E2-Lösung pipettiert, wodurch eine 10^{-4} M E2-Lösung entstand. Aus der 10^{-4} M E2-Lösung wurden wiederum 10 μ l zur vorgelegten 990 μ l R-Lösung pipettiert. Für die Faserpräparation wurden 3 ml Pufferlösung eingesetzt. Dafür wurden 2970 μ l R-Lösung in einem Becherglas vorgelegt und 30 μ l der 10^{-6} M E2-Lösung hinzupipettiert, sodass die gewünschte E2-Konzentration von 10^{-8} mol/l erreicht wurde.

2.5 Herstellung der Lösungen für die *In-vivo*-Versuchsreihe

E2-Stammlösung

In der *In-vivo*-E2-Studie sollten männlichen und weiblichen Wildtypmäusen eine einmalige intraperitoneale Injektion von E2 in physiologischer Konzentration (2,6 μ g/ 25 g Maus) verabreicht werden.

Dazu wurde zunächst eine E2-Stammlösung aus einem dextrin-ummantelten, wasserlöslichen E2 hergestellt. Es wurden 2,625 mg E2 eingewogen und in 1 ml ddH₂O gelöst. Dies entspricht einer E2-Konzentration von 125 μ g/ml. Diese Lösung wurde zu 50 μ l aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Am Versuchstag wurde die E2-Stammlösung 1:5 in Natriumchloridlösung (NaCl) verdünnt. In 105 μ l der verdünnten E2-Lösung ist die für eine 25 g Maus zuvor berechnete Dosis enthalten.

ER β -Agonist

Für die *In-vivo*-Versuchsreihe standen zwei verschiedene ER β -Agonisten, Compound A und Compound E der Firma Karobio, zur Verfügung. Zusätzlich wurde eine Kontrolllösung folgender Zusammensetzung verwendet: 5 % DMSO, 40 % PEG 400, 55 % Wasser. Von beiden Agonisten sind 1,7 mg/ml in der Kontrolllösung gelöst.

Die Injektion mit Compound A sollte die gleiche Konzentration wie die verabreichte E2-Dosis haben. Die Bindungsaffinität von Compound A zum ER β ist 10-fach niedriger, als die von E2 (EC₅₀ 17 β Estradiol = 0,5nM, EC₅₀ Compound A = 5nM), daher musste die 10-fach höhere Konzentration von Compound A für die Injektion eingesetzt werden. (26 μ g pro 25 g Maus)

Die Compound A-Lösung wurde am Versuchstag 1:10 mit NaCl verdünnt. In 1 μ l der verdünnten Lösung sind 0,17 μ g des Agonisten enthalten, sodass für eine Dosis von 26 μ g pro 25g Maus 152,9 μ l Compound A-Lösung injiziert wurde. Die Kontrolllösung wurde in gleicher Weise verdünnt wie die Compound A-Lösung und es wurde die gleiche Dosis verabreicht.

Der zweite ER β -Agonist, Compound E, sollte ebenfalls in dieser Versuchsreihe getestet werden. Da die Bindungsaffinität von Compound E zu ER β 8-fach geringer als die von E2 ist, musste die 8-fach höhere Konzentration von Compound E (20,8 μ g/ 25g Maus) verabreicht werden.

In analoger Weise zur Compound A-Lösung erfolgte am jeweiligen Versuchstag auch für die Compound E-Lösung eine 1:10 Verdünnung mit NaCl. Die gewünschte Dosis von 20,8 μ g pro 25 g Maus war in 122,3 μ l Compound E-Lösung enthalten. Nach Umrechnung auf das tatsächliche Mausgewicht wurde diese injiziert.

ER α -Agonist

Für den ER α -Agonisten PPT musste zunächst eine Stammlösung hergestellt werden. Bei einem Molekulargewicht von 395,46 g/mol wurden 3,9 mg PPT eingewogen und in 1 ml DMSO gelöst. Einer 25 g schweren Maus sollten 5,2 μ g PPT injiziert werden. 1,33 μ l der PPT Stammlösung enthalten 5,2 μ g PPT. Es folgte eine 1:100 Verdünnung mit NaCl; die verdünnte PPT-Lösung wurde bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurden einer 25 g Maus 100 μ l der verdünnten PPT-Lösung injiziert.

2.6 Herstellung der Substrate für die mitochondriale Sauerstoffmessung

Glutamat

L-Glutamat hat ein Molekulargewicht von 169,1 g/mol. Für eine 1 M Lösung wurden 1,691 g eingewogen und in 10 ml ddH₂O gelöst. Anschließend wurde die Glutamat-Lösung zu 1 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Malat

Bei einem Molekulargewicht von 134,09 g/mol wurden für 10 ml einer 1 M Malat-Lösung 1,34 g Malat eingewogen und mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt. Die Malat-Lösung wurde zu 1 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Palmitoyl-Carnitin

Es wurde eine 10⁻² M-Stock-Lösung angesetzt. Dazu wurde bei einem Molekulargewicht von 436,1 g/mol 4,36 mg Palmitoyl-Carnitin in 1 ml ddH₂O gelöst.

Mg-ADP

Bei einem Molekulargewicht von 501,3 g/mol wurden für 2 ml einer 0,5 M ADP-Lösung 501,3 mg ADP eingewogen und zunächst in 1350 µl ddH₂O gelöst. Anschließend wurden 100 µl 0,5 M MgCl₂-Lösung hinzugefügt.

Dann wurde der pH-Wert mit Teststreifen ermittelt und zunächst 350 µl KOH zu der Lösung pipettiert. Der pH-Wert wurde mit KOH und HCl auf einen Wert von 7,1 eingestellt und die Lösung auf das Endvolumen mit ddH₂O aufgefüllt. Die ADP-Lösung wurde zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Rotenon

Für eine 0,5 mM Rotenon-Lösung wurden bei einem Molekulargewicht von 394 g/mol 1,97 mg eingewogen und in 10 ml EtOH_{absolut} gelöst. Die Lagerung von Rotenon erfolgte bei -20 °C.

Succinat

Für die Herstellung einer 1 M Succinat-Lösung wurden bei einem Molekulargewicht von 270,1 g/mol 2,701 g eingewogen und zunächst in 7 ml ddH₂O gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,1 mit 37 % HCl wurde die Lösung auf 10 ml mit ddH₂O aufgefüllt.

Die Succinat-Lösung wurde zu je 500 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Cytochrom C

Zur Herstellung einer 0,8 mM Cytochrom-C-Lösung wurden 39 mg der Substanz eingewogen und in 4 ml ddH₂O gelöst. Die Cytochrom-C-Lösung wurde aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Azid

Azid hat ein Molekulargewicht von 65,01 g/mol. Für die Herstellung von 5 ml einer 1 M-Lösung wurden 325 mg Azid eingewogen und anschließend mit ddH₂O auf 5 ml aufgefüllt. Die Azid-Lösung wurde zu je 500 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Oligomycin

Bei einem Molekulargewicht von 791 g/mol wurde für eine 1 mM Oligomycin-Lösung 0,791 mg der Substanz eingewogen und in 1 ml 50% igen EtOH gelöst. Die Lagerung von Oligomycin erfolgte bei -20 °C.

3. Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben G0027/11, die am 24.03.2011 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGes) genehmigt wurden.

3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden ausschließlich männliche und weibliche Wildtypmäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (ad libitum) und wurden in Gruppen unter spezifiziert pathogenfreiem Status (SPF) in IVC-Standardkäfigen in klimatisierten Räumen gehalten. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Tages-/Nacht-Rhythmus. Vor Versuchseinsatz wurden die Zyklusstadien der weiblichen Tiere mittels vaginalen Abstriches bestimmt. Weibliche Mäuse, die sich im Östrus befanden, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

Die Tierhaltung und die Tierexperimente wurden durch das Komitee für Tierschutz an der Charité-Universitätsmedizin Berlin geprüft und gemäß den Vorgaben durchgeführt.

3.2 Studiendesign

Die Konzeption der vorliegenden Studie sah die Einteilung in zwei Teilbereiche vor. Der erste Teil bestand aus der *Ex-vivo*-Versuchsreihe, in deren Rahmen basale Geschlechterunterschiede und der Einfluss von E2 auf die mitochondriale Atmung in isolierten kardialen Faserpräparaten untersucht werden sollte. Im Anschluss erfolgte die *In-vivo*-Versuchsreihe, in der die lebenden Tiere mit E2 oder den ER-Agonisten behandelt wurden.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen die genaue Vorgehensweise für beide Teilbereiche.

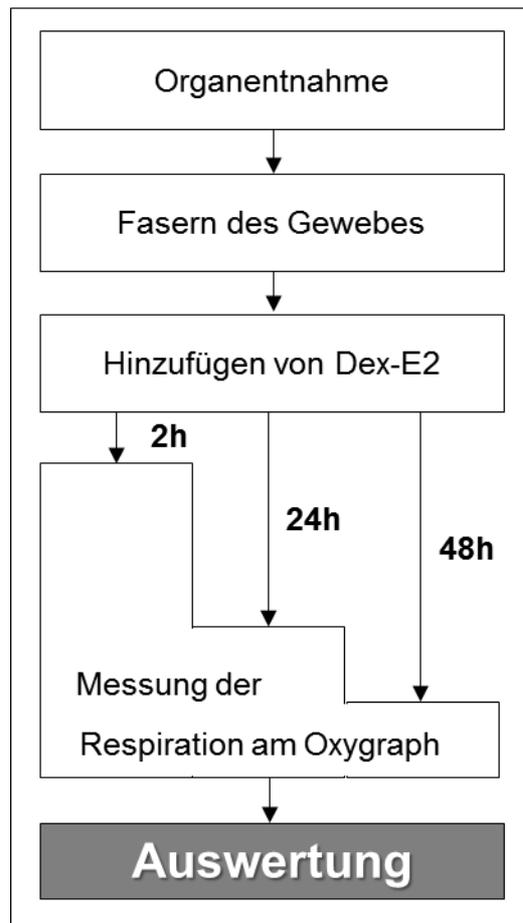


Abbildung 6: Studiendesign der *Ex-vivo*-Versuchsreihe.

Nach der Organentnahme wurden die kardialen Faserpräparate hergestellt und anschließend mit E2 oder der Kontrollsubstanz für 2h, 24h oder 48h behandelt. Danach folgte die respirometrische Messung im Oxygraphen. Dex = Dextrin = Kontrolllösung

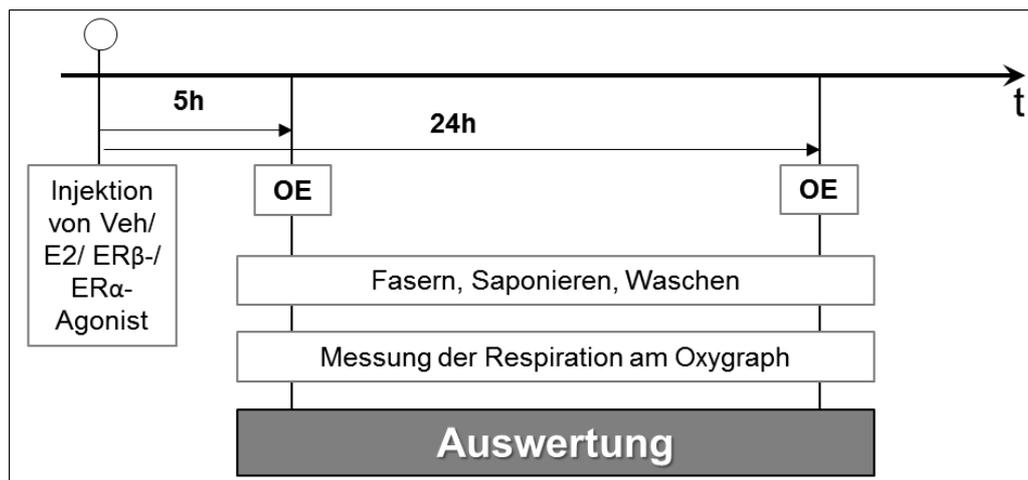


Abbildung 7: Studiendesign der *In-vivo*-Versuchsreihe.

Nach einmaliger Injektion von E2 bzw. den ER-Agonisten oder der Kontrollsubstanz erfolgte nach 5h Wirkzeit und in einer weiteren Versuchsreihe zum 24h-Zeitpunkt die Organentnahme. Im Anschluss wurden die Faserpräparate hergestellt und nach weiterer Aufarbeitung im Oxygraphen gemessen. Veh = Vehicle = Kontrolllösung; OE = Organentnahme; t = Zeit

3.2.1 *Ex-vivo*-Experimente

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Gruppenzusammensetzung und die Tieranzahl in der *Ex-vivo*-Versuchsreihe.

Tabelle 4: Anzahl der Tiere und Gruppenzusammensetzung für die *Ex-vivo*-Experimente.

Behandlung	Männliche Tiere		Weibliche Tiere	
	Vehicle	E2	Vehicle	E2
2h	5	5	5	5
24h	5	5	5	5
48h	5	5	5	5

Es wurden Wildtypmäuse vom Stamm C57/Bl6J (Firma Harlan Winkelmann) im Alter von 9-12 Wochen untersucht. Die *skinned fibers* wurden entweder mit E2 oder einer Kontrolllösung für jeweils 2h, 24h und 48h behandelt. Anschließend erfolgte die respirometrische Messung der *skinned fibers* mittels eines Oxygraphen (Beschreibung der Methode unter 3.3).

3.2.2 *In-vivo*-Experimente

im zweiten Studienteil wurden männlichen und weiblichen Wildtypmäusen eine einmalige physiologische Dosis E2 (2,6 µg pro 25 g Maus) intraperitoneal injiziert. Nach einer fünf- bzw. 24-stündigen Wirkzeit wurden die Tiere getötet. Die Herzen wurden entnommen und nach Herstellung der *skinned fibers* erfolgten die Respirationmessungen. Bei dieser Versuchsreihe diente Dextrin als Kontrollsubstanz.

In weiteren Versuchsreihen sollte detailliert untersucht werden, über welchen ER eine Östrogenwirkung auf die mitochondriale Respiration vermittelt wird. Zunächst sollte überprüft werden, ob die mitochondrialen E2-Effekte über ERβ vermittelt werden. Dafür wurden männliche und weibliche Tiere zunächst mit einem ERβ-Agonisten für 5h behandelt. Es standen zwei verschiedene Agonisten Compound A und Compound E zur Verfügung, die beide an fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren im Vergleich zur Kontrolle getestet wurden.

Eine weitere analoge Versuchsreihe wurde mit dem ERα-Agonisten PPT durchgeführt. Als Kontrolllösung wurde DMSO verwendet, indem das PPT der Stammlösung zuvor gelöst wurde.

Die Tabellen 5 und 6 geben die Gruppenzusammensetzung und Anzahl der Tiere für die jeweiligen Untersuchungen wieder.

Tabelle 5: Übersicht über die 5h *In-Vivo*-Behandlungen mit E2, ER β -und ER α -Agonist.

Behandlung 5h <i>in vivo</i>	Männliche Tiere	Weibliche Tiere
Vehicle Dextrin	6	6
E2	6	6
Vehicle ER β / ER α Agonist	5	5
ER β -Agonist Compound A	5	5
ER β -Agonist Compound E	5	5
ER α -Agonist PPT	5	5

Um eine Vergleichbarkeit zur E2-Studie zu gewährleisten, wurde auch für die jeweiligen ER-Agonisten ein Behandlungszeitraum von 24h gewählt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht über die 24h *In-Vivo*-Behandlungen mit E2, ER β -und ER α -Agonist.

Behandlung 24h <i>in vivo</i>	Männliche Tiere	Weibliche Tiere
Vehicle Dextrin	6	6
E2	6	6
Vehicle ER β und ER α Agonist	5	5
ER β -Agonist Compound A	5	5
ER α -Agonist PPT	5	5

3.3 Faserpräparatherstellung – *Skinned-fiber*-Technik

Für die Untersuchung von mitochondrialen Respirationsparametern im kardialen Gewebe wird das erstmalig von Veksler beschriebene Verfahren zur Herstellung von *skinned fibers* als Alternative zu der sehr aufwendigen Mitochondrienisolation verwendet.⁵⁴

Die *Skinned-fiber*-Technik beruht auf einer mechanischen und chemischen Permeabilisierung der Muskelfasern. Dabei werden die Muskelfasern zuerst mithilfe von feinen Kanülen vorsichtig aufgefasernt und anschließend in einer Pufferlösung mit Saponin behandelt. Aufgrund der sehr hohen Bindungsaffinität von Saponin zu Cholesterol wird die sehr cholesterolreiche Zellmembran der Muskelfasern permeabilisiert, wohingegen die Zellmembranen der Mitochondrien und anderer Zellorganellen intakt bleiben.⁵⁵

Wie in Abbildung 8 gezeigt, werden durch die Porenbildung in der Zellmembran das Zytosol und die darin gelösten Metabolite und Enzyme ausgewaschen, sodass sich der Intrazellularraum mit dem extrazellulären Inkubationsmedium equilibriert. Daher können die funktionell intakt gebliebenen Mitochondrien schnell auf Konzentrationsänderungen von Ionen, Adenin-Nukleotiden, Substraten und Inhibitoren reagieren.

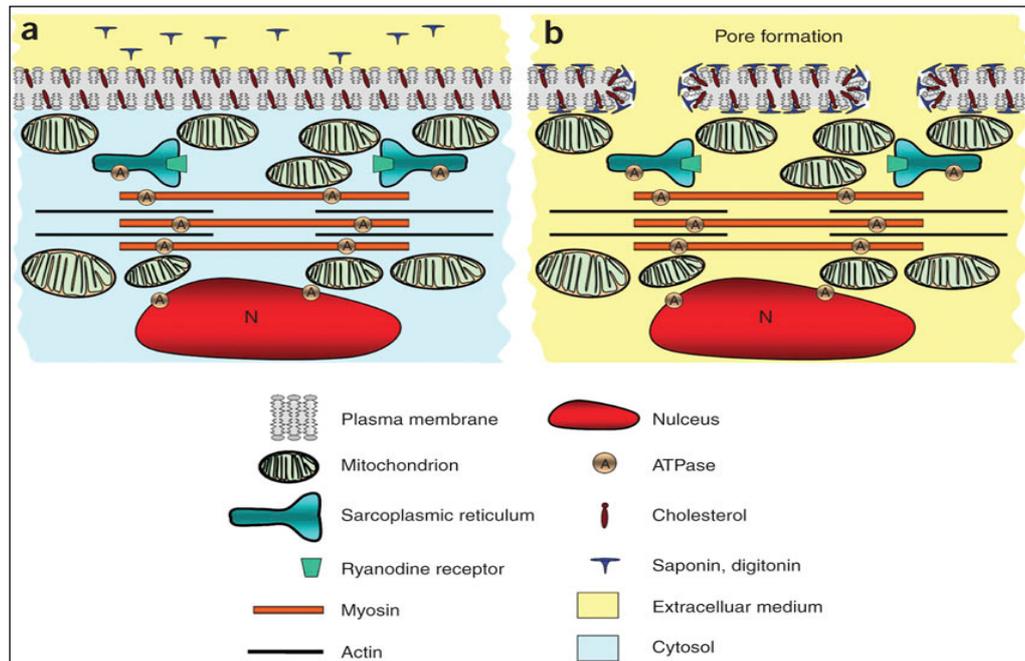


Abbildung 8: Prinzip der selektiven Plasmamembran-Permeabilisation.⁵⁵

a) Muskelzelle vor und b) nach Saponin-Behandlung.

3.3.1 Herstellung der *skinned fibers*

Nach fachgerechter Tötung der Mäuse wurden die Herzen entnommen und mit einem speziellen Inkubationsmedium, dem zuvor oxygenierten Krebs-Henseleit-Puffer, gespült. Anschließend wurde das Herzgewicht bestimmt. Danach wurden die Vorhöfe und der rechte Ventrikel entfernt, sodass die weiteren Präparationsschritte an linkem Ventrikel und Septum erfolgten (Abbildung 9). Zusätzlich wurden die *Musculi solei* präpariert.



Abbildung 9: Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der Faserung am Beispiel des Musculus solei aus Ratte.⁵⁵

a) isolierter gesamter Muskel in einer Petrischale auf Eis; b) einzelne Muskelfaserstreifen in S-Lösung, Fett und Bindegewebe wurden entfernt; c) aufgefaserete Muskelfaserbündel, die mit Saponin permeabilisiert wurden.

Linker Ventrikel und beide Skelettmuskeln wurden in eine Petrischale mit saponinhaltiger Pufferlösung (S-Lösung) überführt, in der die weitere Präparation auf Eis erfolgte. Zur besseren Faserung wurde der linke Ventrikel in zwei gleich große Stücke geschnitten.

Nach Entfernung des Myokards wurde das Endokard zerfasert. Dabei wurden zwei Injektionsnadeln verwendet, wobei mit einer das Gewebe fixiert und mit der anderen vorsichtig darübergestrichen wurde. Das Fasern sollte nicht länger als 20 Minuten dauern, da anderenfalls die Faserpräparate ischämisch werden könnten.

3.3.2 Aufarbeitung der *skinned fibers*

Die Fasern wurden in ein Becherglas mit S-Lösung überführt und darin 30 Minuten im Kühlraum bei 4°C auf dem Magnetrührer (Umdrehungsgeschwindigkeit 250 U/min) saponiert. Nach der Saponinbehandlung erfolgten zwei Waschvorgänge von jeweils 10 Minuten Dauer mit je 3 ml R-Lösung.

3.3.3 Aufbau des Oxygraphen

Die mitochondriale Atmung in den Herz- und Skelettmuskelfasern wurde durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs mithilfe eines Oxygraphen der Firma Hansatech-Instruments untersucht (Abbildung 10).



Abbildung 10: Oxygraph-Messeinheit mit Messkammer und eingesetzter Clark-Typ-Elektrode (Hansatech-Instruments).

Der Oxygraph besteht aus zwei separaten Messkammern, die durch ein Schlauchsystem mit einem Wasserbad in Verbindung stehen, sodass die Messungen bei konstanter Temperatur von 25°C durchgeführt wurden. Die Messkammern enthalten jeweils eine Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ, die aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode besteht. Die Elektroden sind von einer 17,5 %igen KCl-Lösung umgeben und mit einer PTFE (Teflon)-Membran bedeckt, die für Sauerstoff durchlässig ist. Unter der Membran befindet sich zur gleichmäßigen Verteilung der Elektrolytlösung zwischen Anode und Kathode ein Stück Zellulosepapier.⁵⁶

In Abbildung 11 sind die an den Elektroden ablaufenden Reaktionen dargestellt. Bei einer Spannung von 700 mV wird der durch die Membran diffundierte Sauerstoff an der Platin-Kathode zu OH^- reduziert. Der gemessene Stromfluss ist direkt proportional zur Sauerstoffkonzentration in der Messprobe.

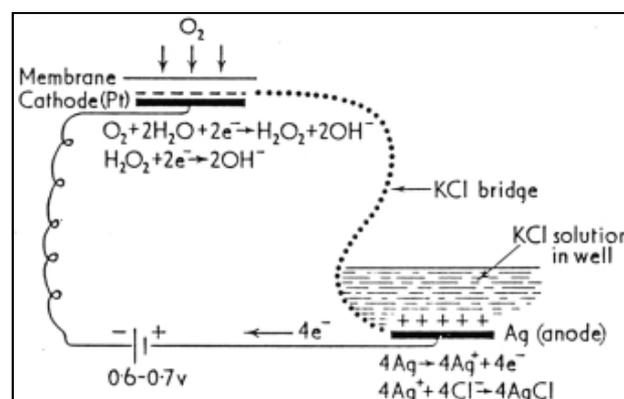


Abbildung 11: Darstellung der Reaktionen an der Clark-Elektrode.⁵⁶

Der in der Messkammer enthaltene Sauerstoff diffundiert durch die Membran und wird an der Platin-Kathode zu OH^- reduziert. Somit fließt ein Strom zwischen den Elektroden, die durch die KCl-Lösung miteinander in Verbindung stehen. An der Silber-Anode wird Silber oxidiert und Silberchlorid lagert sich an der Anode ab. Der gemessene Stromfluss ist proportional zum Sauerstoffverbrauch an der Kathode.

Durch gleichmäßiges elektromagnetisches Rühren wird die Probe optimal durchmischt, sodass eine Sauerstoffverarmung an der Platin-Kathode verhindert wird.⁵⁶

Die Software *Oxygraph Plus* der Firma Hansatech Instruments zeichnet die Signale der Clark-Elektrode auf und zeigt den Sauerstoffverbrauch in nmol/ ml pro Minute an.

3.3.4 Vorbereitung der Elektroden

Nach Anschalten des Wasserbades wurden die Elektroden zunächst visuell auf Sauberkeit überprüft. Anschließend wurden einige Tropfen einer 17,5 %igen KCL-Lösung auf die Platin-Kathode und die Silber-Anode gegeben. Für die beiden Elektroden wurden jeweils ein Stück Zellulosepapier der Größe 1 x 1 cm und ein Stück PTFE-Teflonmembran von 1,5 x 1,5 cm Größe zurecht geschnitten. Das Stück Papier wurde unter der Membran auf der Kathode platziert und anschließend mit einem Gummiring befestigt. Die membranbespannten Elektroden wurden in die Messkammern eingesetzt, sodass die Elektroden den Boden des Reaktionsgefäßes bildeten. Anschließend wurde jeweils 1 ml steriles H₂O in die beiden Messkammern pipettiert.

3.3.5 Kalibrierung der Elektroden

Die Kalibrierung erfolgte immer am Tag der Messung mit dem aktuellen Luftdruck und in 1 ml H₂O, da die Messung auch in 1 ml KCl- Puffer durchgeführt wurde. Somit handelt es sich um eine Kalibrierung in flüssiger Phase. Die Eichung der Elektroden wurde nach einer Zwei-Punkt-Kalibrierung durch Messung der Sauerstoffkonzentration in der belüfteten, H₂O enthaltenden Messkammer und nach Zugabe von Dithionit (Na₂S₂O₄) durchgeführt. Als starkes Reduktionsmittel verbraucht Dithionit den gesamten Sauerstoff in der Messkammer, sodass die Sauerstoffmessung nach Reduktion dem Nullwert entspricht. Nach abgeschlossener Kalibrierung wird für die Messkammer ein Kalibrierungsfaktor angezeigt, welcher der gesamten Messung zugrunde liegt.

3.3.6 Durchführung der respirometrischen Messung

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs der *skinned fibers* wurde im Oxygraphen in 1 ml KCl-Respirationspuffer unter elektromagnetischem Rühren durchgeführt. Nach Zugabe der KCl-Lösung in die Messkammern steigt die

Sauerstoffkonzentration kurzzeitig auf über 300nM an. Danach normalisiert sich der Sauerstoffgehalt in den Messkammern wieder auf den Umgebungsdruck, sodass mit der Messung der unbehandelten Herz-und Muskelfasern begonnen werden konnte. Dazu wurde der aufgefaserte linke Ventrikel in gleich große Stücke von ca. 3-5 mg Feuchtgewicht separiert. Jeweils ein Herzmuskelstück wurde in die Messkammer gegeben; anschließend wurden diese mit einem Stopfen luftdicht verschlossen. Die Stopfen enthalten im Inneren eine Kapillare, durch die mit Hilfe von Hamiltonspritzen Substrate in die Kammern verabreicht wurden.

Zunächst wurde die basale Atmung der *skinned fibers* in Gegenwart der Substrate Glutamat und Malat aufgezeichnet (Abbildung 12). Glutamat und Malat sind wichtige Substrate der OxPhos, da sie durch die Bildung von NADH über den Komplex I in die Atmungskette eintreten. Anschließend wurde die mitochondriale Atmung durch die Zugabe von jeweils 4 µl ADP (0,5 mM) (2mM gesättigte Lösung) in die Messkammern maximal stimuliert. Diese gemessene maximale Respirationsrate bei Vorhandensein von ausreichend ADP, Sauerstoff und Substraten wird als State-3-Atmung bezeichnet.

Nachfolgend wurden 10 µl Rotenon in die Messkammern appliziert, welches selektiv den Komplex I der Atmungskette inhibiert. Danach konnte mit der Zugabe von 10 µl Succinat die Respirationsrate des Komplexes II aufgezeichnet werden. Zur Überprüfung der äußeren Mitochondrienmembran und deren Kopplung wurden nach zwei Minuten 10 µl Cyt C pro Kammer injiziert. Cyt C ist ein peripheres Protein der inneren Mitochondrienmembran. Bei intakter äußerer Mitochondrienmembran ändert sich die Respirationsrate nach Zugabe von Cyt C nicht, wohingegen bei Membranschäden das endogene Cyt C aus dem Intermembranraum freigesetzt wird und die Atmung verringert. Das exogene Cyt C kann dann zu einem Anstieg der Respirationsrate führen.

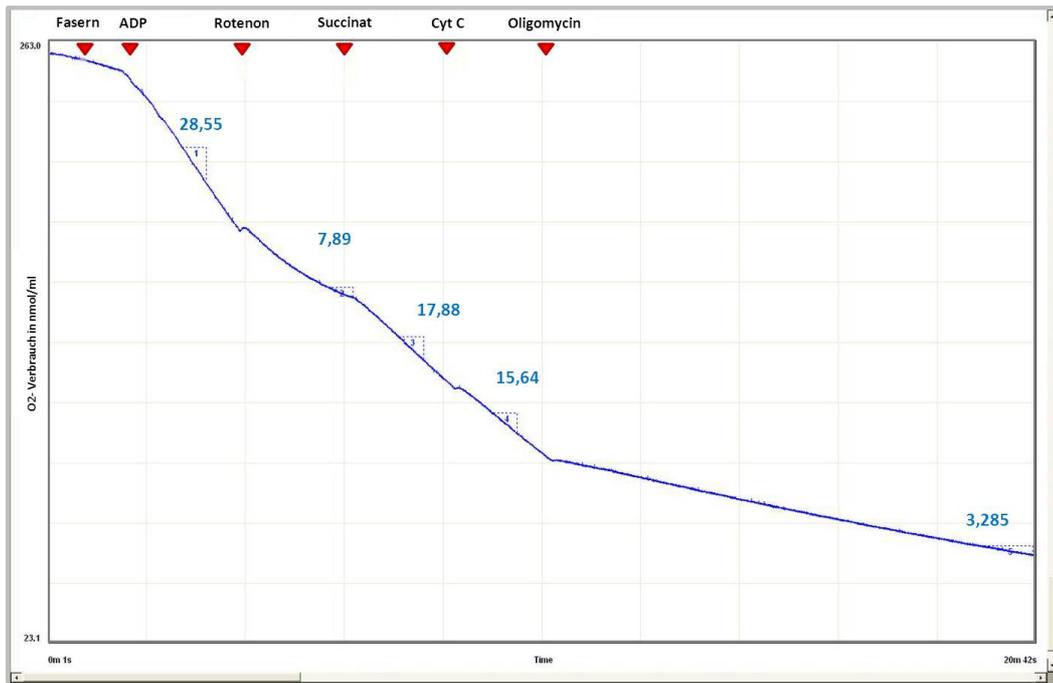


Abbildung 12: Aufzeichnung einer typischen Oxygraphmessung für kardiale *skinned fibers* aus gesundem Mausegewebe.

Der Kurvenverlauf zeigt die Veränderung der Sauerstoffkonzentration (Y-Achse) über die Zeit (X-Achse) an. In der Auswertung der Messung werden die Respirationsraten für die unterschiedlichen Atmungszustände als erste Ableitung dieser Funktion bestimmt. Zunächst wird die basale Atmung der *skinned fibers* in Gegenwart der Substrate Glutamat und Malat aufgezeichnet. Nach Zugabe von ADP in die Messkammer steigt der Sauerstoffverbrauch stark an, die maximale Atmungsrate beträgt hier 28,55 nmol/ml/min (State-3-Atmung). Rotenon hemmt den Komplex I, sodass der Sauerstoffverbrauch auf 7,89 nmol/ml/min absinkt. Die Succinat-Atmung erreicht eine maximale Respirationsrate von 17,88 nmol/ml/min. Danach erfolgt der Cyt C-Test: die Respirationsrate steigt nach Cyt C nicht an. Zum Schluss wird Oligomycin in die Messkammer injiziert und die Respirationsrate sinkt auf 3,285 nmol/ml/min (State-4-Atmung).

Nach dem Cyt C-Test kann die Entkoppelung der OxPhos durch die Zugabe von jeweils 7,5 µl Azid erfolgen, das Cyt C und Komplex IV der Atmungskette hemmt. Die Azid-Ionen blockieren das aktive Zentrum der Cytochrom-C-Oxidase irreversibel, sodass keine Sauerstoffbindung mehr möglich ist. So kommt es letztendlich zur Akkumulation von Elektronen, wodurch alle Komponenten der OxPhos-Kette reduziert werden und somit ihre Funktion verlieren.

Mit der Applikation von jeweils 3 µl Oligomycin in die Messkammern wird die F₁/F₀-ATP-Synthase blockiert und somit die State-4-Atmung erreicht, die die Respiration unter Abwesenheit von ADP beschreibt. Die mitochondriale Atmung müsste eigentlich zum Stillstand kommen. Es werden zwar sehr niedrige Atmungsraten registriert, jedoch wird nie der Nullwert erreicht, da noch eine sogenannte Leakatmung existiert. Diese beruht auf der Tatsache, dass auch während der

Abwesenheit von ADP ein Protonenfluss über die innere Mitochondrienmembran in den Matrixraum existiert.⁵⁷

3.3.7 Respiratorischer Kontrollindex (RCI)

Der respiratorische Kontrollindex wird als Quotient aus der State-3-Atmung und der State-4-Atmung berechnet:

$$\text{RCI} = \frac{\text{State-3-Atmung}}{\text{State-4-Atmung}}$$

RCI ist ein Maß für die Kopplung von Atmungskette und OxPhos in den Mitochondrien und erlaubt Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der untersuchten Mitochondrien. Durch Schäden an der inneren Mitochondrienmembran wird der Rückfluss von Protonen in den Matrixraum ermöglicht, was zur Substratoxidation ohne ATP-Synthese führt. Daraus resultiert eine erhöhte State-4-Atmung und ein kleiner RCI. Je geringer der Zahlenwert ist, desto stärker sind die Mitochondrien geschädigt. Der RCI sollte für kardiale *skinned fibers* aus Wildtypmäusen bei 7-9 liegen.⁵⁵

3.3.8 Substrat und Inhibierungsversuche

Neben der respirometrischen Messung mit den oben beschriebenen Substraten können mithilfe von Substrat- und Inhibierungsversuchen die einzelnen Komplexe der OxPhos näher untersucht werden (Abbildung 13).

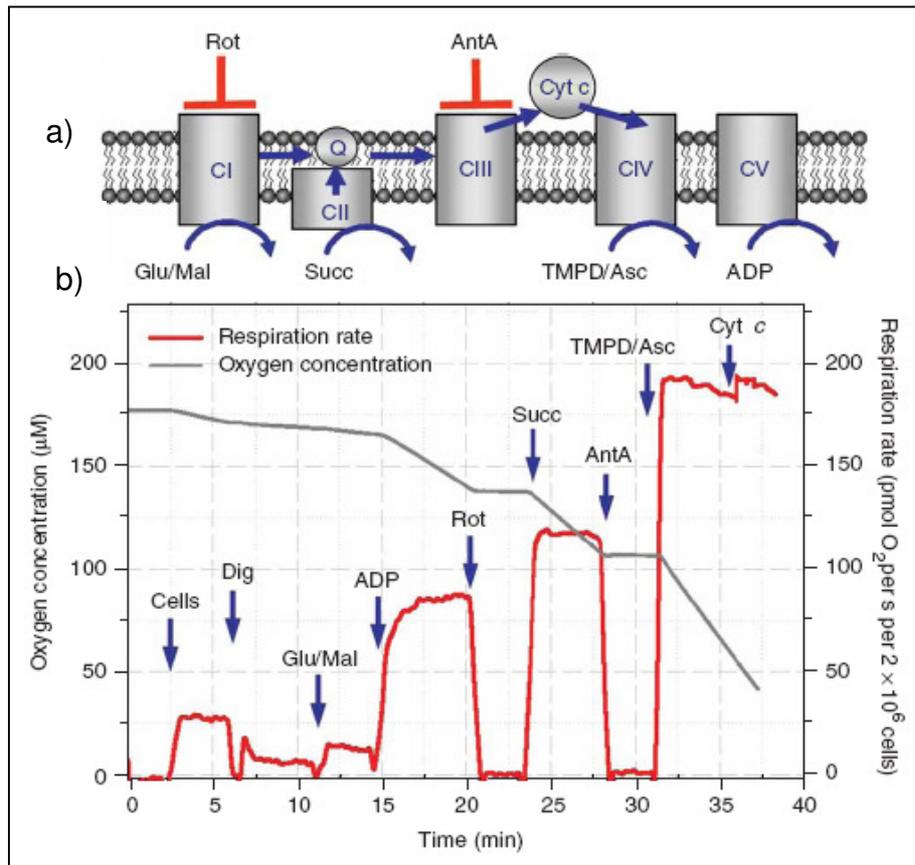


Abbildung 13: Darstellung der Substrat- und Inhibierungsstudien.⁵⁵

Abbildung a) zeigt den schematischen Aufbau der mitochondrialen Atmungskette sowie die Substrate und Inhibitoren der einzelnen Komplexe: Glu/Mal = Glutamat und Malat Substrate für Komplex I, Rot = Rotenon, hemmt Komplex I. Succ = Succinat Substrat für Komplex II, Ant A = Antimycin A hemmt Komplex III. TMPD/Asc = TMPD und Ascorbat Substrate für Komplex IV, ADP Substrat von Komplex V.

Abbildung b) gibt eine Oxygraphmessung von permeabilisierten Zellen mit durchgeführten Substrat- und Inhibierungsstudien wieder. Die graue Kurve stellt die Sauerstoffkonzentration dar, die rote Kurve zeigt die Respirationsrate. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Zugabe der Substrate und Hemmstoffe.

So kann zum Beispiel mit der Zugabe von Rotenon oder Amytal selektiv der Komplex I der Atmungskette inhibiert werden, sodass keine Elektronen mehr von Komplex I auf Ubichinon übertragen werden können.

Danach wurde Succinat in die Messkammern appliziert, um Komplex II der Atmungskette zu stimulieren und somit die Atmungsrate nur für diesen Komplex zu bestimmen. Des Weiteren konnte mit der Zugabe von Antimycin der Komplex III gehemmt und anschließend mit TMPD und Ascorbat Komplex IV der Atmungskette aktiviert werden. Die Hemmung des Komplexes IV erfolgte mit Azid. Zum Schluss wurde Oligomycin in die Messkammern gegeben, um die State-4-Atmung zu erhalten.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Respirationsmessungen erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows. Für die basalen Respirationsmessungen wurden die Mittelwerte der State-3-Atmung, der State-4 Atmung und des RCI zwischen der männlichen und der weiblichen Versuchsgruppe bzw. zwischen der Glutamat/Malat und der Palmitoyl-Carnitin-Gruppe mit einem unabhängigen t-Test verglichen.

Auch in der *Ex-vivo*-Versuchsreihe wurde mit den Mittelwerten der Respirationsraten und des RCI aus der E2-Gruppe und der Kontrollgruppe für die verschiedenen Messzeitpunkte ein unabhängiger t-Test durchgeführt. Bei den t-Tests wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Bei den *In-vivo*-Versuchen ergaben sich vier Versuchsgruppen: die männlichen und weiblichen Kontrolltiere und die männlichen und weiblichen behandelten Tiere. Die Mittelwerte der State-3-Atmung, der State-4-Atmung und des RCI der vier Gruppen wurden jeweils mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) untersucht. Als *Post-hoc*-Analyse wurde ein Tukey-B-Test angeschlossen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

Die grafische Darstellung aller Ergebnisse erfolgte in Form von Säulendiagrammen, in denen die Mittelwerte der Atmungsraten und des RCI mit der Standardabweichung abgebildet sind ($MW \pm SD$).

4. Ergebnisse

4.1 Basale mitochondriale Respiration

4.1.1 Die basale mitochondriale Respiration mit den Substraten Glutamat/ Malat zeigt keine geschlechtsspezifischen Unterschiede

In der ersten Versuchsreihe wurden die basalen Respirationsraten für unbehandelte männliche und weibliche Wildtypmäuse verglichen.

Als Substrate für die mitochondriale Atmung wurden Glutamat und Malat verwendet, die sowohl in der R-Lösung als auch in der KCI-Lösung enthalten waren.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte nach Zugabe von ADP, Cyt C und Oligomycin. Die Respirationsraten wurden in Anwesenheit von ADP (State-3-Atmung) und in Abwesenheit von ADP (State-4-Atmung) bestimmt und auf das Trockengewicht (TG) der *skinned fibers* bezogen. Zusätzlich wurde der RCI berechnet.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der basalen Respirationsmessungen für die männlichen und weiblichen Tiere.

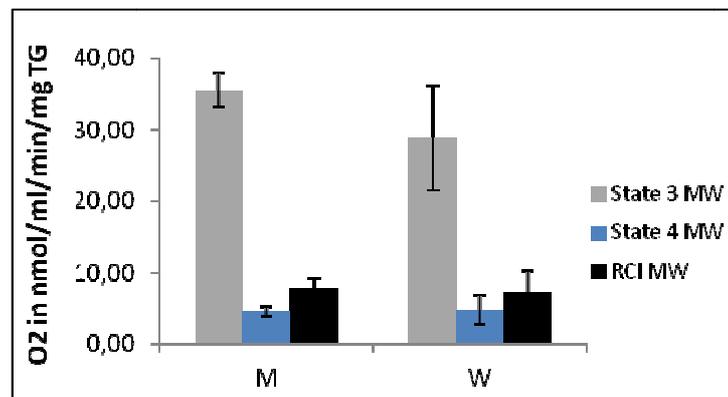


Abbildung 14: Darstellung der basalen mitochondrialen Respiration in unbehandelten männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; * gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Die Respirationsraten der State-3- sowie der State-4-Atmung und der RCI in männlichen und weiblichen Tieren wurden vergleichend gegenübergestellt.

Es konnten keine Geschlechterunterschiede im Sauerstoffverbrauch (State-3- und State-4-Atmung) in unbehandelten Wildtypmäusen festgestellt werden. Die State-

3-Respirationsraten lagen in den weiblichen Faserpäraraten im Mittel bei 28 nmol O₂/ mg TG und in den männlichen Faserpäraraten bei 35 nmol O₂/ mg TG. Diese Werte entsprechen den aus der Literatur bekannten Respirationsraten für linke Ventrikel aus Mäuseherzen.⁵⁵

Der RCI unterschied sich ebenfalls nicht zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Dieser lag in beiden Geschlechtern bei 7, sodass von gut gekoppelten Mitochondrien auszugehen war.⁵⁵

4.1.2 Die basale mitochondriale Respiration mit der Fettsäure Palmitoyl-Carnitin zeigt keine Geschlechterunterschiede

Die Messung der basalen Respiration wurde auch für die Fettsäure Palmitoyl-Carnitin als Substrat der mitochondrialen Atmung durchgeführt.

In vier männlichen und weiblichen Wildtypmäusen wurden die Respirationsraten mit Glutamat/Malat mit denen von Palmitoyl-Carnitin verglichen. Eine Messkammer enthielt die KCl-Lösung mit Glutamat/Malat, die andere mit Palmitoyl-Carnitin-Lösung, sodass jeweils ein direkter Vergleich beider Substrate pro Mausherz möglich war (Abbildung 15).

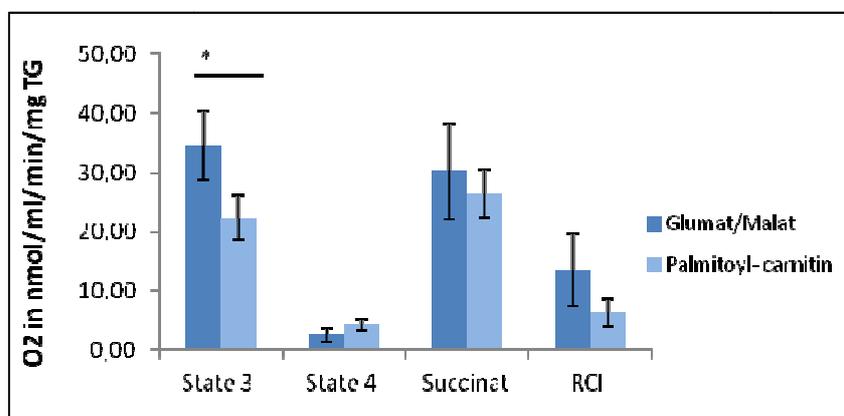


Abbildung 15: Darstellung der mitochondrialen Respiration mit den Substraten Glutamat/Malat im Vergleich zu Palmitoyl-Carnitin in männlichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3-, State-4- und der Succinat-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. TG = Trockengewicht; n = 4 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz P ≤ 0,05 an.

Abbildung 15 zeigt, dass der Sauerstoffverbrauch der State-3-Atmung mit den Substraten Glutamat und Malat mit 35 nmol O₂/ mg TG im Mittel signifikant höhere Werte erreichte als mit Palmitoyl-Carnitin mit einem Mittel von 22 nmol O₂/ mg TG. Die State-4-Atmung unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant.

Durch die Zugabe von Rotenon wurde bei dieser Versuchsreihe selektiv der Komplex I der Atmungskette inhibiert und durch die Applikation von Succinat der Komplex II stimuliert. So konnten die Respirationsraten nur für die Succinat-Atmung bestimmt werden, die sich zwischen den Substraten nicht unterschieden.

Der RCI war für die basale Respiration mit Glutamat/Malat in der Tendenz höher als der RCI der Palmitoyl-Carnitin-Atmung.

Bei den weiblichen Tieren wurden ähnliche Ergebnisse generiert (Abbildung 16).

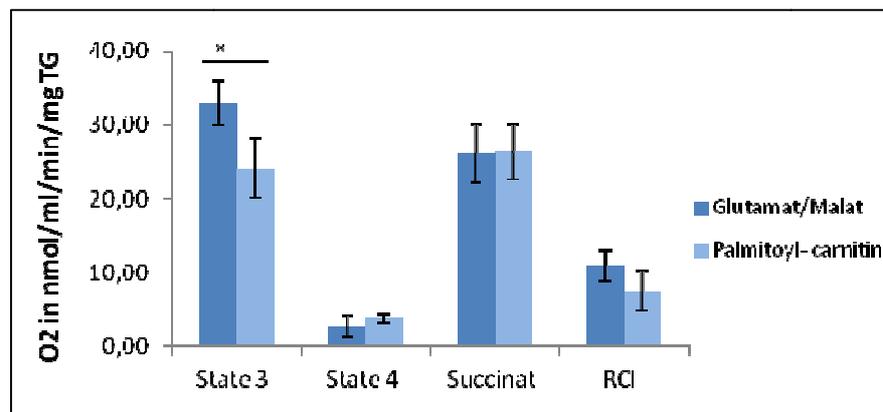


Abbildung 16: Darstellung der mitochondrialen Respiration mit den Substraten Glutamat/Malat im Vergleich zu Palmitoyl-Carnitin in weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3-, State-4- und der Succinat-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. TG = Trockengewicht; n = 4 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Wie aus Abbildung 16 deutlich wird, war auch in den weiblichen Tieren die Respirationsrate der State-3-Atmung für die Substrate Glutamat/Malat signifikant höher im Vergleich zu der von Palmitoyl-Carnitin. Die State-4- und die Succinat-Atmung waren in beiden Gruppen gleich. Auch bei den weiblichen Tieren zeigte der RCI der Glutamat/Malat-Atmung in der Tendenz höhere Werte als der RCI mit Palmitoyl-Carnitin; dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte kein Geschlechterunterschied in der Substratpräferenz für die basale mitochondriale Atmung festgestellt werden.

4.2 *Ex-vivo* Versuche

4.2.1 Die E2-Langzeitbehandlung der skinned fibers für 24h und 48h erhält die mitochondriale Respiration

Die *Ex-vivo*-Stimulationsversuche mit E2 erfolgten für fünf männliche und fünf weibliche Tiere an je drei unterschiedlichen Messzeitpunkten im Abstand von 2h,

24 und 48h nach der Behandlung. Nach der jeweiligen Behandlungszeit wurden die mit E2 behandelten *skinned fibers* parallel zu den mit Dextrin behandelten Fasern im Oxygraphen gemessen.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse für die zweistündige E2-Behandlung der *skinned fibers* dargestellt. Die Messwerte für die *skinned fibers* aus männlichen und weiblichen Tieren wurden in einem Diagramm zusammengefasst, da keine signifikanten Geschlechterunterschiede festgestellt wurden.

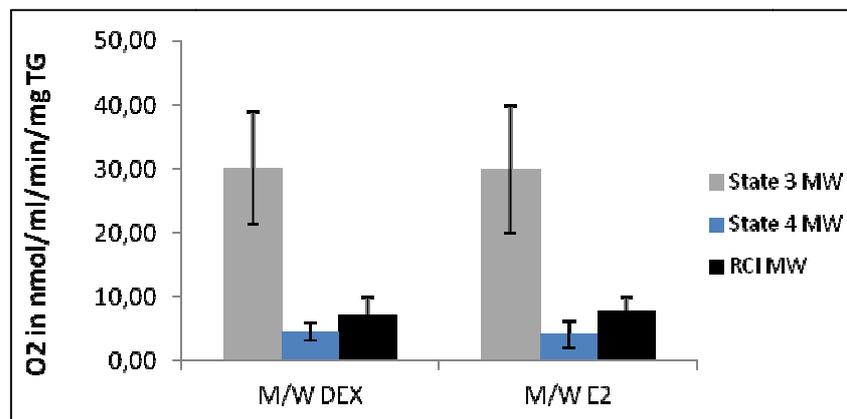


Abbildung 17: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 2h E2-Behandlung *ex vivo* der kardialen *skinned fibers* im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.

Die Messwerte für die männlichen und weiblichen Tiere sind zusammengefasst. M = Männchen; W = Weibchen; Dex = Dextrin; E2 = 17 β -Östradiol; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Nach einer zweistündigen E2-Behandlung der kardialen *skinned fibers* zeigte sich kein Unterschied in der State-3-Atmung und dem RCI. Analog zur Darstellung der Ergebnisse für die zweistündige E2-Behandlung sind die Werte für die 24-stündige E2-Behandlung der kardialen *skinned fibers* aus männlichen und weiblichen Tiere in Abbildung 18 zusammengefasst.

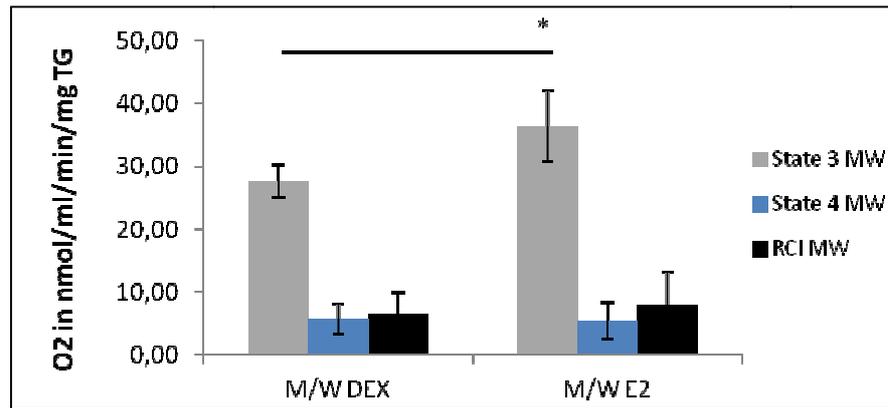


Abbildung 18: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h E2-Behandlung *ex vivo* der kardialen *skinned fibers* im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.

Die Messwerte für die männlichen und weiblichen Tiere sind in dem Diagramm zusammengefasst.

M = Männchen; W = Weibchen; Dex = Dextrin; E2 = 17 β -Östradiol; TG = Trockengewicht n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Die 24h-Behandlung führte in beiden Geschlechtern zu einer signifikant höheren State-3-Respiration in den E2-behandelten Fasern im Vergleich zu den mit Dextrin behandelten Kontrollen. Der Mittelwert der State-3-Atmung von den 24h E2-behandelten Fasern aus männlichen und weiblichen linken Ventrikeln lag bei 36 nmol O₂/ mg TG, die dextrinbehandelten Fasern zeigten Respirationsraten von 27 nmol O₂/ mg TG. Der RCI unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant.

Wie Abbildung 19 verdeutlicht, konnte auch nach 48h ein E2-Effekt auf die OxPhos in kardialen Mitochondrien gezeigt werden, der sich in beiden Geschlechtern gleich darstellte (Abbildung 19).

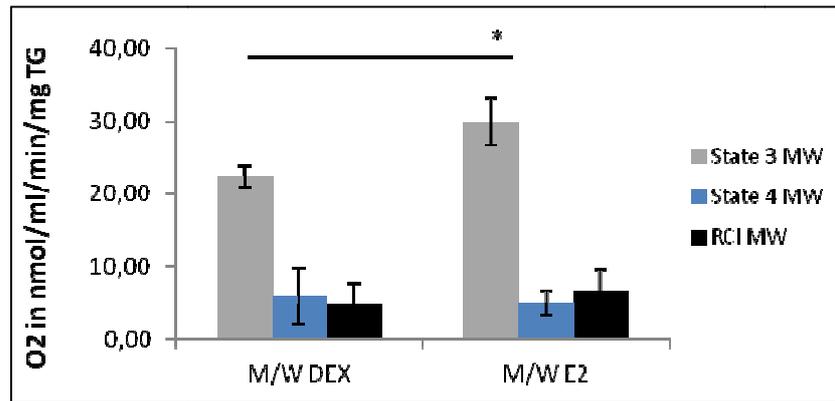


Abbildung 19: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 48h E2-Behandlung *ex vivo* der kardialen *skinned fibers* im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.

Die Messwerte für die männlichen und weiblichen Tiere sind zusammengefasst.

M = Männchen; W = Weibchen; Dex = Dextrin; E2 = 17 β -Östradiol; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; * gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Nach der Langzeitbehandlung der *skinned fibers* für 48h in R-Lösung konnten für die State-3-Atmung Respirationsraten zwischen 20 und 30 nmol O₂/ mg TG erreicht werden. Dabei wurde, wie nach 24h, ein signifikanter Unterschied im Sauerstoffverbrauch während der State-3-Atmung zwischen den mit E2 und Dextrin behandelten Fasern gemessen. Die State-3-Atmung der mit E2 behandelten *skinned fibers* lag im Mittel bei 30 nmol O₂/ mg TG, die der Kontrollen bei 22 nmol O₂/ mg TG. Somit lagen die Respirationsraten der Kontrollen nach 48h deutlich unter den Werten der basalen Messung zum Zeitpunkt 0h. Die Behandlung der *skinned fibers* mit E2 konnte dagegen die State-3-Atmung nach 48h auf dem Ausgangsniveau erhalten. Für den RCI ergaben sich in beiden Gruppen geringere Werte im Vergleich zu früheren Untersuchungszeitpunkten. Dieser lag in der E2-Gruppe bei 6 und damit in der Tendenz höher als der RCI der Kontrollgruppe.

Die E2-Stimulation *ex vivo* wurde ebenfalls in Skelettmuskelfasern aus *Musculi solei* der männlichen und weiblichen Tiere durchgeführt. Die respirometrischen Messungen erfolgten mit unbehandelten Skelettmuskelfasern und nach 24h-Behandlung der Fasern mit E2 oder Dextrin.

Die Ergebnisse der basalen Respirationsmessungen von unbehandelten Skelettmuskelfasern sind Abbildung 20 dargestellt.

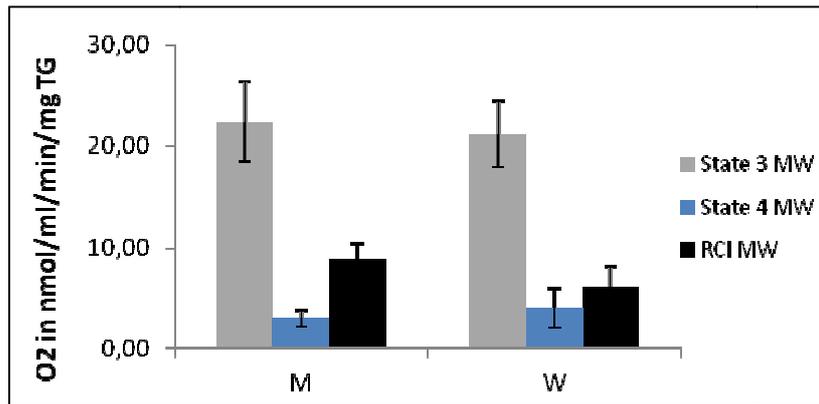


Abbildung 20: Darstellung der basalen mitochondrialen Respiration in Skelettmuskelfasern aus unbehandelten männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Die Respirationsraten und der RCI sind für männliche und weibliche Tiere im Vergleich gegenübergestellt. In unbehandelten Skelettmuskelfasern wurden, äquivalent zu den unbehandelten kardialen *skinned fibers*, keine Geschlechterunterschiede in der State-3-Atmung und im RCI festgestellt. Die State-3-Atmung ist im Skelettmuskelgewebe generell geringer als im linken Ventrikel und lag in dieser Messreihe für männliche und weibliche Tiere im Mittel bei 20 nmol O_2 / mg TG.

Die Ergebnisse der 24h E2-Stimulation der Skelettmuskelfasern sind in Abbildung 21 dargestellt.

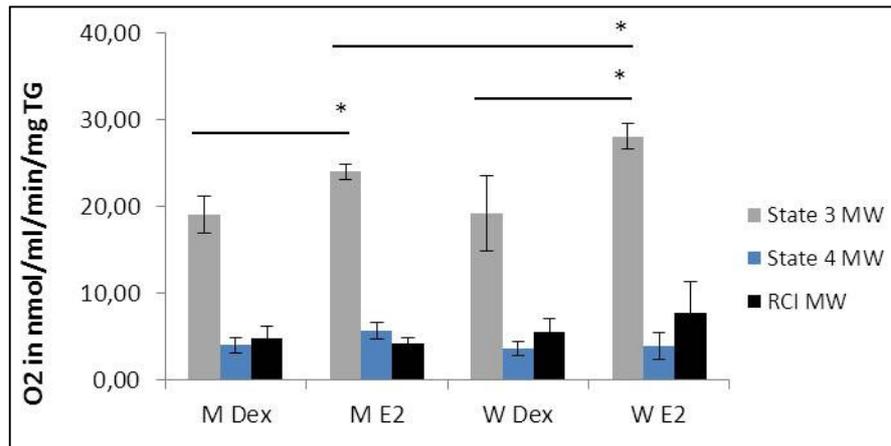


Abbildung 21: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h *Ex-vivo*-E2-Behandlung der Skelettmuskelfasern im Vergleich zu den dextrinbehandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Die Respirationsraten und der RCI in den E2 behandelten Skelettmuskelfasern sind für beide Geschlechter im Vergleich zu den dextrin-behandelten Fasern dargestellt. Sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Tieren führte die 24-stündige E2-Behandlung zu einer signifikant erhöhten State-3-Atmung. Der E2-Effekt war in den Muskelfasern der weiblichen Tiere stärker ausgeprägt; hier wurden signifikant höhere Respirationsraten im Vergleich zu den E2-behandelten *skinned fibers* aus den männlichen Tieren erreicht.

Die State-3-Respiration der mit E2 stimulierten Fasern lag für die weiblichen Tiere bei 28 nmol O₂/ mg TG und für die männlichen bei 24 nmol O₂/ mg TG.

Insgesamt wurde in der *Ex-vivo*-E2-Studie deutlich, dass E2 die Kapazität der OxPhos in Mitochondrien aus Herz- und Skelettmuskelgewebe nach 24h und 48h Behandlungszeit aufrechterhalten kann.

4.3 E2-Behandlung *in vivo*

4.3.1 Die E2-Behandlung *in vivo* steigert die mitochondriale Respiration in beiden Geschlechtern

Auf Basis der Ergebnisse aus den *Ex-vivo*-Versuchen wurden für die *In-vivo*-Stimulationsversuche mit E2 Behandlungszeiträume von 5 und 24h gewählt. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der E2-Stimulation nach 5h dargestellt.

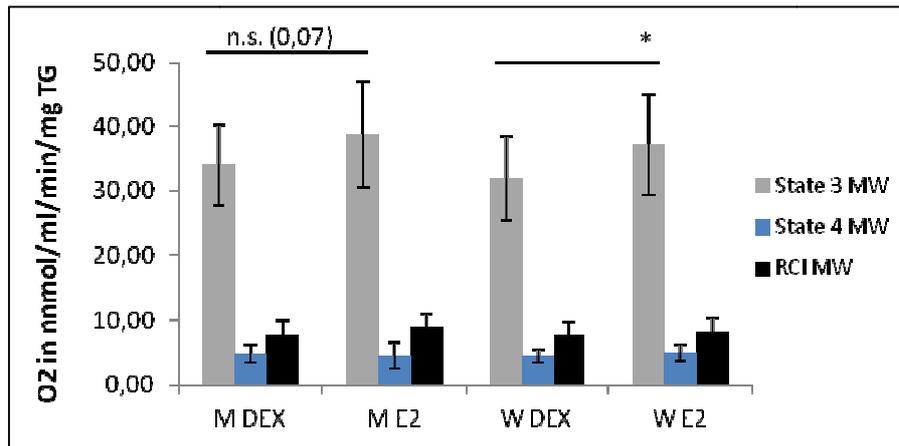


Abbildung 22: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 5h E2-Behandlung *in vivo* im Vergleich zu den mit Dextrin behandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 6 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

State-3-, State-4-Atmung und RCI der männlichen und weiblichen mit E2 behandelten Tiere wurden den dazugehörigen Kontrolltieren gegenübergestellt. In den männlichen Tieren zeigte sich ein Effekt des E2 auf die mitochondriale Respiration. Für die State-3-Atmung wurde im Mittel bei den behandelten Tieren O_2 -Werte von 39 nmol/ mg TG und bei den Kontrollen von 33 nmol O_2 / mg TG gemessen. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

In den weiblichen Tieren führte die E2-Behandlung nach 5h zu einer signifikant erhöhten State-3-Respiration. Der Mittelwert der State-3-Atmung in der E2-Gruppe lag bei 37 nmol O_2 / mg TG und in der Kontrollgruppe bei 31 nmol O_2 / mg TG. Im RCI zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Im Vergleich dazu wurde nach 24h E2-Behandlung in beiden Geschlechtern eine signifikant erhöhte State-3-Atmung gegenüber den Kontrollen gemessen (Abbildung 23).

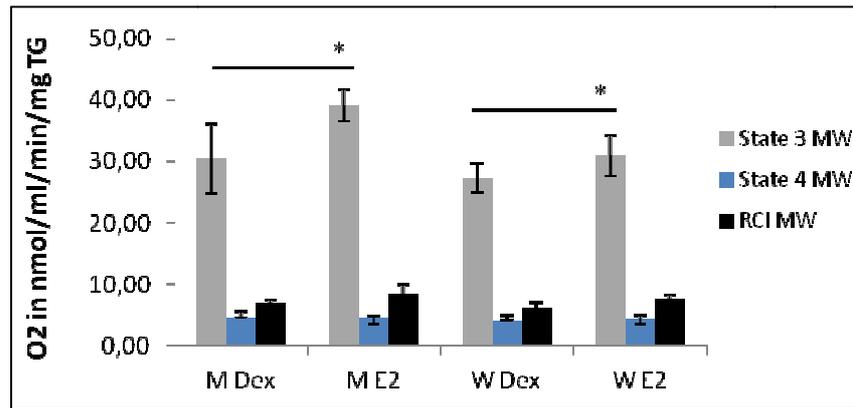


Abbildung 23: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h E2-Behandlung *in vivo* im Vergleich zu den mit Dextrin behandelten Kontrollen in männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State 3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 6 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Im Gegensatz zur Stimulation nach 5h war der Unterschied in der State-3-Atmung zwischen E2- und Kontrollgruppe in den männlichen Tieren stärker ausgeprägt. Dabei lag der maximale Sauerstoffverbrauch wie schon nach der 5h-Behandlung bei 39 nmol O₂/ mg TG, ohne E2 sank die State-3-Respiration auf 30 nmol O₂/ mg TG.

In den weiblichen Tieren konnten nach 24h E2-Behandlung nicht die Respirationsraten der 5h-Stimulation erreicht werden. Der Mittelwert der State-3-Atmung lag nur bei 30 nmol O₂/ mg TG, war aber im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant höher. In beiden Geschlechtern ergaben sich für den RCI in den mit E2 behandelten Tieren in der Tendenz höhere Werte im Vergleich zu den Kontrollen.

Im Rahmen der respirometrischen Messungen der In-vivo-Versuchsreihe wurde gezielt der Komplex II durch die Zugabe von Succinat stimuliert. Dabei wurde kein Einfluss von E2 auf den Sauerstoffverbrauch der Succinat-Atmung festgestellt.

Die respirometrischen Messungen wurden auch für Skelettmuskelgewebe durchgeführt. Dabei konnten weder nach 5h noch nach 24h E2-Effekte auf die State-3-Atmung eruiert werden.

In der *In-vivo*-E2-Studie wurde deutlich, dass E2 bereits nach 5h die mitochondriale Atmung der kardialen *skinned fibers* in beiden Geschlechtern

steigern kann. Dieser E2-Effekt war nach 24h in den männlichen Tieren stärker ausgeprägt.

Mit den folgenden *In-vivo*-Studien sollte die Rolle der ER in der Vermittlung der E2-Effekte auf die Atmungskette näher untersucht werden.

4.3.2 Die *In-vivo*-Behandlung mit einem ER β -Agonisten steigert in beiden Geschlechtern die mitochondriale Respiration

Zunächst erfolgte mit den beiden verfügbaren ER β -Agonisten Compound A und Compound E eine 5h-Behandlung von jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, führten beide Substanzen zu den gleichen Ergebnissen (Abbildung 24).

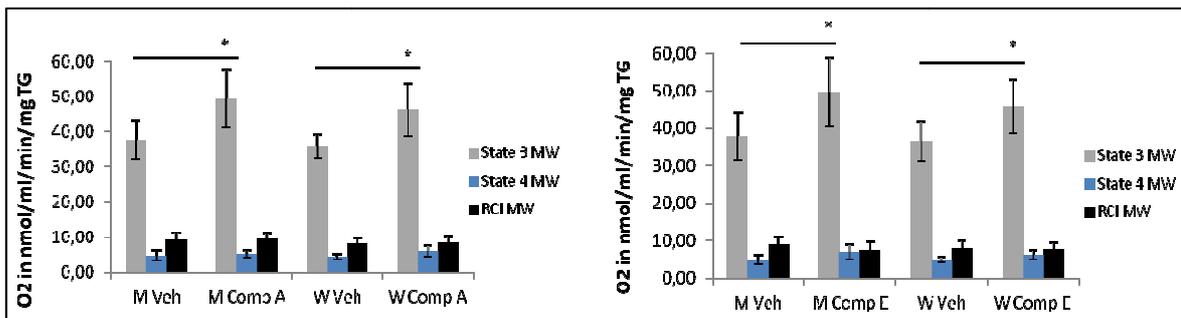


Abbildung 24: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 5h *In-vivo*-Behandlung mit Compound A (links) und Compound E (rechts) in männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Die *In-vivo*-Behandlung mit Compound A und Compound E führte in gleicher Weise zu signifikant erhöhten State-3-Respirationsraten in beiden Geschlechtern. In den männlichen mit ER β -Agonist behandelten Tieren stieg der Sauerstoffverbrauch der State-3-Atmung auf 49 nmol O₂/ mg TG, in den weiblichen Tieren auf 46 nmol O₂/ mg TG an. Im RCI zeigten sich keine Unterschiede zwischen den mit ER β -Agonist behandelten Tieren und den Kontrollgruppen.

Im Vergleich zur E2-Behandlung nach 5h wurden mit dem selektiven ER β -Agonisten höhere State-3-Respirationsraten in beiden Geschlechtern erreicht. Bereits nach 5h Behandlung mit Compound A oder Compound E konnte in den

männlichen Tieren im Gegensatz zur E2-Versuchsreihe ein signifikanter Unterschied in der State-3-Atmung festgestellt werden, der im Vergleich zu den weiblichen Tieren stärker ausgeprägt war.

Da beide Substanzen nach 5h die gleiche Wirksamkeit zeigten, wurde die 24h ER β -Agonist-Versuchsreihe nur mit Compound A durchgeführt. Die Ergebnisse der mitochondrialen Respiration nach 24h ER β -Agonist-Behandlung sind in Abbildung 25 dargestellt.

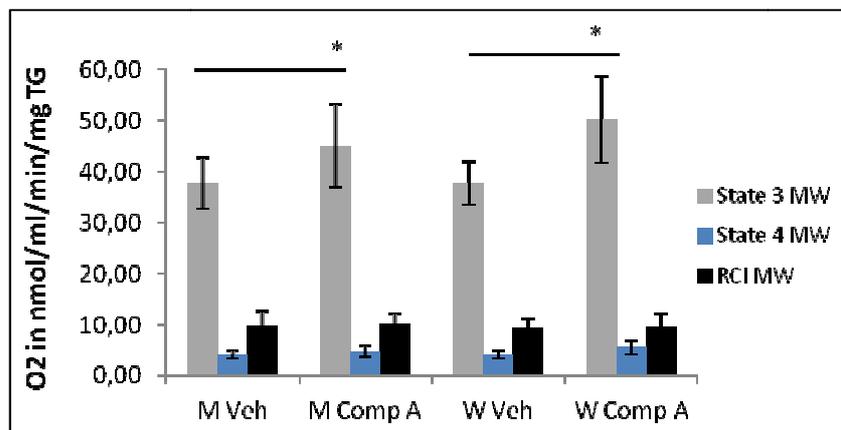


Abbildung 25: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h *In-vivo*-Behandlung mit Compound A in männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Ebenso wie nach 5h steigerte der ER β -Agonist auch nach 24h die State-3-Atmung in beiden Geschlechtern signifikant. Im Gegensatz zur 5h-Stimulation zeigten die weiblichen Tiere höhere Werte für die State-3-Atmung (50 nmol O₂/ mg TG) als die männlichen Tiere (44 nmol O₂/ mg TG).

Auch für den 24h-Vergleich wurde deutlich, dass die Behandlung mit einem ER β -Agonisten den gleichen Effekt ausweist wie eine E2-Stimulation. Dabei wurden in den mit ER β -Agonist behandelten Tieren höhere State-3-Respirationsraten gemessen als in den mit E2 behandelten Tieren.

In der Versuchsreihe mit dem ER β -Agonisten wurden die respirometrischen Messungen auch für Skelettmuskelgewebe durchgeführt. Nach der 5h-Behandlung mit Compound A oder Compound E konnten keine Unterschiede in der State-3-Atmung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 24h

auch im Skelettmuskel ein signifikanter Unterschied in der mitochondrialen Respiration (Abbildung 26).

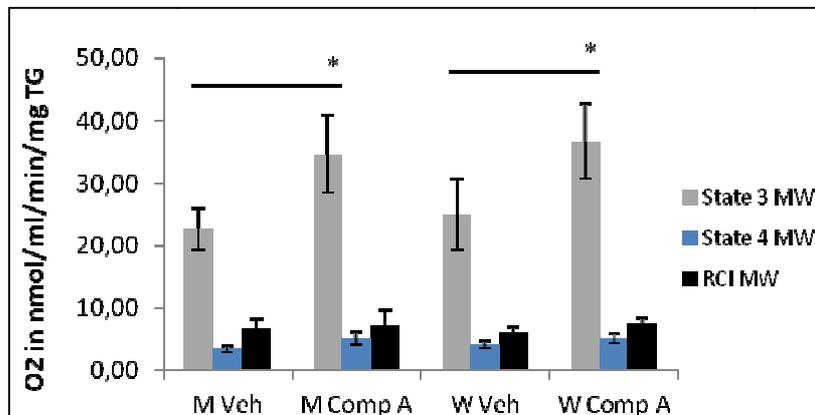


Abbildung 26: Darstellung der mitochondrialen Respiration in Skelettmuskelfasern nach 24h *In-vivo*-Compound-A-Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

In männlichen und weiblichen mit Compound A behandelten Tieren stieg die State-3-Atmung der Skelettmuskelfasern in gleicher Weise an. Im Mittel lagen die Werte der State-3-Respiration in den männlichen Tieren bei 34 nmol O_2 / mg TG, in den weiblichen Tieren bei 36 nmol O_2 / mg TG.

Die erhöhten Respirationsraten nach E2-Stimulation konnten mit der ER β -Agonist-Behandlung für beide Versuchszeitpunkte reproduziert werden.

4.3.3 Die *In-vivo*-Behandlung mit einem ER α -Agonisten führt nach 5h nur in den männlichen Tieren zur gesteigerten mitochondrialen Respiration

In gleicher Weise wurde die Rolle des ER α in der Vermittlung der E2-Effekte auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch untersucht. Dazu wurden jeweils fünf männliche und fünf weibliche Tiere mit dem ER α -Agonisten PPT für 5h und 24h behandelt.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Respirationsmessungen nach 5h Behandlung mit PPT dargestellt.

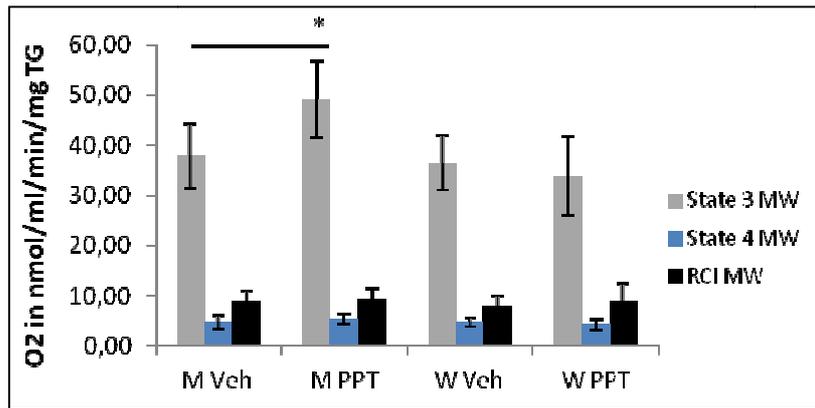


Abbildung 27: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 5h *In-vivo*-PPT-Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht n = 5 Tiere pro Gruppe;*gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Nach 5h PPT-Behandlung zeigte sich ein Geschlechterunterschied in den State-3-Respirationsraten. In den weiblichen Tieren hatte PPT keinen Effekt auf die State-3-Atmung. In den männlichen Tieren hingegen führte der ER α -Agonist zu einer signifikant höheren State-3-Respiration im Vergleich zu den Kontrollen. Wie bei der ER β -Agonist-Behandlung stieg auch mit PPT der Sauerstoffverbrauch in den männlichen Tieren auf 49 nmol O₂/ mg TG.

Nach 24h zeigten sich in beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede in den Respirationsraten zwischen den PPT-behandelten Tieren und den Kontrollen (Abbildung 28).

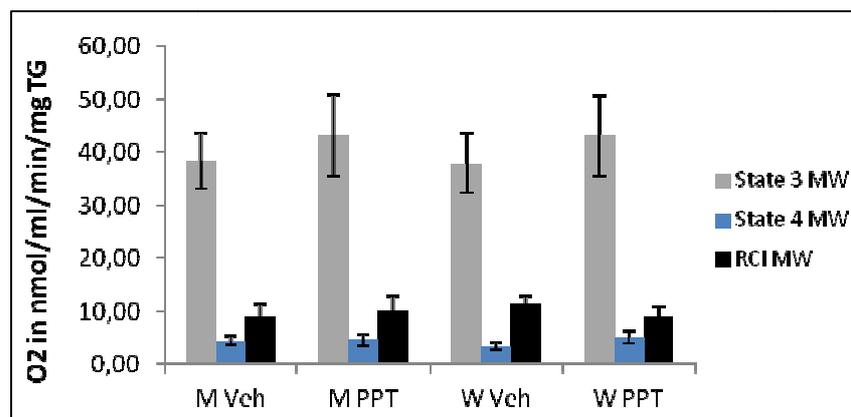


Abbildung 28: Darstellung der mitochondrialen Respiration nach 24h *In-vivo*-PPT-Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe;*gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

Die State-3-Atmung der mit PPT behandelten Tiere lag im Mittel bei 43 nmol O₂/mg TG und damit leicht über den Respirationsraten der Kontrollen; im Gegensatz zu der 24h-E2- oder -ERβ-Agonist-Behandlung war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

Im Skelettmuskelgewebe zeigten sich nach 5h Behandlung mit PPT keine Unterschiede in den State-3-Respirationsraten. Zum Zeitpunkt 24h wurde nur in den Skelettmuskelfasern der männlichen mit PPT behandelten Tieren eine erhöhte State-3-Atmung festgestellt; in den weiblichen Tieren unterschieden sich die Respirationsraten zwischen den Gruppen nicht.

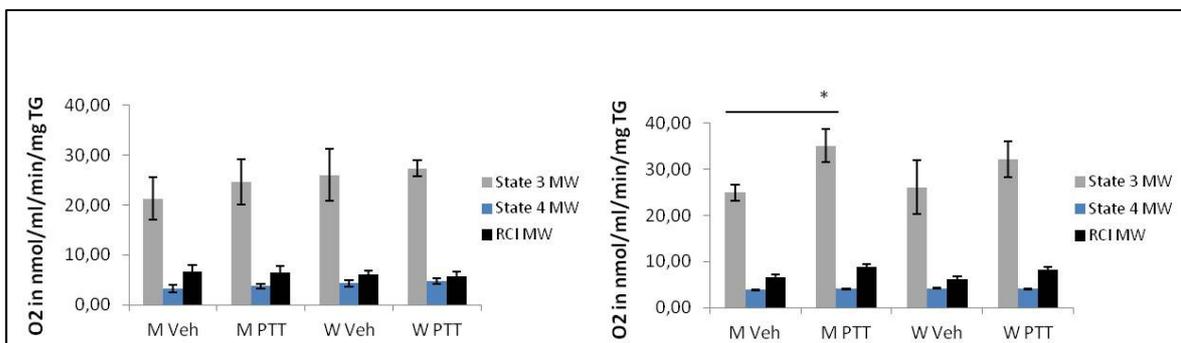


Abbildung 29: Darstellung der mitochondrialen Respiration in Skelettmuskelfasern nach 5h und 24h In-vivo-PPT- Behandlung von männlichen und weiblichen Tieren.

Der Sauerstoffverbrauch der State-3- und State-4-Atmung wird in nmol/ml/min/ mg Trockengewicht angegeben. M = Männchen; W = Weibchen; TG = Trockengewicht; n = 5 Tiere pro Gruppe; *gibt Signifikanz $P \leq 0,05$ an.

4.4 Morphologische Daten: Herz-und Uterusgewichte

Im Rahmen der *In-vivo*-Stimulationsversuche mit E2 und den ER-Agonisten wurden nach Tötung der Tiere die Herzgewichte bestimmt, um einen möglichen Effekt der Behandlung mit E2 oder den ER-Agonisten festzustellen. Dazu wurden die Herzgewichte auf die Tibialänge normalisiert (HG/TL). Die Tibialänge ist eine relativ konstante Größe und ist unabhängig vom Körpergewicht, Fettanteil und Muskelmasse.

Tabelle 7: Übersicht über die Herzgewichte nach 5h Behandlung.

Behandlung	Männliche Tiere			Weibliche Tiere		
	Herzgewicht (HG) in mg	Tibiallänge (TL) in mm	HG/TL	Herzgewicht (HG) in mg	Tibiallänge (TL) in mm	HG/TL
Kontrolle	103,40	17,07	6,05	85,00	15,80	5,38
E2	108,18	16,66	6,44	87,02	15,82	5,50
Comp A	112,84	17,02	6,62	97,58	16,46	5,93
Comp E	129,45	16,85	7,67	91,25	16,43	5,56
PPT	94,2	15,78	5,97	107,04	16,62	6,43

Die 5h E2- bzw. ER-Agonisten- Behandlung führte zu keiner signifikanten Veränderung des HG/TL-Quotienten in männlichen und weiblichen Tieren.

Die Herzgewichte der männlichen Tiere waren mit Ausnahme der PPT behandelten Tiere in allen Gruppen höher als in den weiblichen Tieren (Tabelle 7). Darüber hinaus wurden den weiblichen Tieren die Uteri entfernt und deren Gewicht bestimmt. Nachfolgende Tabelle stellt die Mittelwerte der Uterusgewichte für die verschiedenen Behandlungsgruppen dar (Tabelle 8).

Tabelle 8 : Übersicht über die Uterusgewichte nach 5h Behandlung.

	Kontrolle	E2	Comp A	Comp E	PPT
Uterusgewicht (mg)	52,98	101,15	100,67	134,63	70,23

Nach 5h E2-Behandlung stieg das Uterusgewicht signifikant an, wodurch die Effektivität der E2-Behandlung nachgewiesen wurde. Die beiden ER β -Agonisten konnten den E2-Effekt auf das Uterusgewicht reproduzieren. Im Gegensatz dazu führte die PPT-Behandlung nur zu einem geringen Anstieg des Uterusgewichts. Das unterschiedliche Ausmaß des Effekts der ER-Agonisten auf das Uterusgewicht kann auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Tiere nicht ovariectomiert wurden und somit endogene Östrogeneinflüsse nicht ausgeschlossen werden können.

5. Diskussion

In verschiedenen Studien wurde die Hypothese untersucht, ob die Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung einer MH auf Unterschiede in der kardialen mitochondrialen Funktion männlicher und weiblicher Organismen und auf den Einfluss von E2 zurückzuführen sind.^{12,14,15}

Die Wirkung von E2 auf die Respirationsraten kardialer Mitochondrien wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass E2 die Kapazität der OxPhos in kardialen *skinned fibers* in beiden Geschlechtern steigern kann. Sowohl in der *Ex-vivo*-Versuchsreihe als auch in der *In-vivo*-Studie führte die E2-Langzeitbehandlung zu einer signifikant erhöhten State-3-Respiration. In der *In-vivo*-E2-Studie wurde ein Geschlechterunterschied der E2-Wirkung auf die Respirationsraten zu den beiden Versuchszeitpunkten deutlich, die mit dem endogenen E2-Spiegel der weiblichen Tiere erklärt werden können. Die *In-vivo*-E2-Behandlung wies keinen Effekt auf die Succinat-Atmung (Komplex II) auf. Daraus lässt sich folgern, dass die E2-Wirkung auf die mitochondriale Respiration über Komplex I vermittelt wird.

Die *In-vivo*-Stimulationsversuche mit den ER-Agonisten zeigten, dass der ER β hauptsächlich an der Vermittlung der E2-Effekte auf die mitochondriale Respiration beteiligt ist. Die Behandlung mit dem ER β -Agonisten konnte nach 5h und 24h die Ergebnisse einer E2-Behandlung in beiden Geschlechtern reproduzieren. Demgegenüber führte die Stimulation des ER α mit PPT nach 5h nur in den männlichen Tieren zu einer erhöhten Respirationsrate, nach 24h zeigte sich in beiden Geschlechtern kein Effekt des ER α -Agonisten auf die mitochondriale Respiration.

5.1 Basale mitochondriale Respiration

In den eigenen Untersuchungen zur basalen mitochondrialen Atmung der kardialen *skinned fibers* sowie den Skelettmuskeln mit den Substraten Glutamat und Malat konnte weder in der State-3-Atmung noch beim RCI ein Geschlechterunterschied eruiert werden.

Diese Befunde stehen im Einklang mit der experimentellen Studie von Sanz et al. zu Geschlechterunterschieden in der Mitochondrienfunktion.⁵⁹ Weder für isolierte

Mitochondrien aus Herzen noch aus Skelettmuskeln fanden die Autoren einen Geschlechterunterschied im Sauerstoffverbrauch der State-3-Atmung. Gleiche Ergebnisse wurden auch für den mitochondrialen ATP-Gehalt ermittelt.

In früheren Studien zur Mitochondrienfunktion im braunen Fettgewebe wurde ein Unterschied im mitochondrialen Metabolismus zwischen männlichen und weiblichen Ratten postuliert.⁶⁰⁻⁶² Die weiblichen Tiere zeigten einen höheren Sauerstoffverbrauch und damit einen erhöhten Energieaufwand im Vergleich zu den männlichen Tieren.⁶⁰

Auch für die aus der Leber isolierten Mitochondrien von Ratten konnte ein Geschlechterunterschied in der basalen Respiration gezeigt werden. So war der gemessene Sauerstoffverbrauch der State-3-Atmung in den weiblichen Tieren im Vergleich zu den männlichen doppelt so hoch. Darüber hinaus wurde eine höhere Aktivität der mitochondrialen F_1/F_0 -ATPase in den weiblichen Tieren festgestellt, sodass die Hypothese einer höheren Kapazität der oxidativen Phosphorylierung in weiblichen im Vergleich zu männlichen Ratten bestätigt werden konnte.⁶³ Diese gegensätzlichen Untersuchungsergebnisse legen den Schluss nahe, dass die mitochondriale Respiration in verschiedenen Geweben unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt.

Der kardiale Metabolismus weist basal keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf, wohingegen unter pathologischen Stimuli durchaus Geschlechterunterschiede nachgewiesen wurden.

So konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass sich der myokardiale Metabolismus unter pathologischen Bedingungen geschlechtsspezifisch unterscheidet.^{64,65} Eine Studie zur Funktion des nukleären *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α* (PPAR α) in der zellulären Lipidhomöostase zeigte, dass das Geschlecht einen entscheidenden Einfluss auf den metabolischen Phänotyp in PPAR α -defizienten Mäusen hat. Nach Inhibierung des Fettsäureimportes in die kardialen Mitochondrien wurden in den Wildtypmäusen PPAR α -Zielgene aktiviert, die für Enzyme der Fettsäureoxidation kodieren. In den PPAR α -Knockout-Mäusen führte die Inhibierung des mitochondrialen Fettsäuremetabolismus zu Lipidakkumulation, Hypoglykämie und Tod. Dabei starben 100 % der männlichen PPAR α -defizienten Tiere, wohingegen in den Weibchen die Mortalitätsrate bei 25 % lag.⁶⁴ Die Autoren folgerten aus ihren

Ergebnissen einen Einfluss des Geschlechts auf den kardialen Lipidmetabolismus und postulierten eine für weibliche Tiere erhöhte basale Kapazität der Fettsäureoxidation. Allerdings konnten sie keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Expression von Schlüsselenzymen der Fettsäureoxidation nachweisen.⁶⁴

Fliegner et al. zeigten in ihrer Studie zur drucklastinduzierten MH an Wildtypmäusen basal ebenfalls keine Geschlechterunterschiede im kardialen Metabolismus anhand von Genexpressionsanalysen. Diese traten erst nach einer neunwöchigen drucklastinduzierten MH auf.¹² Diese Befunde bestätigen unsere eigenen Untersuchungen, in denen ebenfalls kein Einfluss des Geschlechts auf die basale mitochondriale Fettsäureoxidation festgestellt werden konnte.

Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass es im Herzen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im basalen kardialen Metabolismus gibt oder aber diese mit den bisher angewandten Untersuchungsmethoden nicht nachgewiesen werden konnten. Unter pathologischen Bedingungen hingegen konnten eindeutige Geschlechterunterschiede gezeigt werden.

5.2 Einfluss von Östrogen auf die mitochondriale Respiration

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe von respirometrischen Messungen der Einfluss einer *Ex-vivo*- bzw. *In-vivo*-E2-Behandlung auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und damit auf die Kapazität der OxPhos im Herzgewebe nachgewiesen werden. In der *Ex-vivo*-Versuchsreihe zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mitochondrialen Respiration der kardialen *skinned fibers* nach einer Langzeitbehandlung mit E2 nach 24h und 48h in beiden Geschlechtern. Nach 2h E2-Behandlung konnte hingegen kein Effekt festgestellt werden. Die Ergebnisse aus der *Ex-vivo*-Studie sind bereits ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei Aktivitätssteigerung der OxPhos um einen E2-Langzeiteffekt handelt, der vermutlich über genomische Signalwege vermittelt wird.

In den *In-vivo*-Untersuchungen wurde bereits nach 5h und ebenso nach 24h ein E2-Effekt auf die State-3-Atmung beobachtet. Dieser war nach 5h E2-Behandlung in den weiblichen Tieren stärker ausgeprägt, wohingegen nach 24h die E2-Wirkung auf die State-3-Atmung verstärkt bei männlichen Tieren auftrat. Der beobachtete Geschlechterunterschied des E2-Effektes zu beiden Messzeitpunkten

könnte mit dem höheren endogenen E2-Serumspiegel der weiblichen Tiere erklärt werden. Möglicherweise führt eine zusätzliche E2-Dosis in den weiblichen Tieren zunächst zu einer stark erhöhten State-3-Atmung und nach 24h wird dieser Effekt durch eine Abnahme der zuvor durch E2 aktivierten ER oder durch Induktion einer verstärkten E2-Metabolisierung abgeschwächt.

In den letzten Jahren befassten sich mehrere Autoren mit dem Einfluss von Östrogen auf die mitochondriale Atmungskette in verschiedenen Geweben, wobei Untersuchungen im Zentralnervensystem (ZNS) im Vordergrund standen. Brinton et al. konnten nachweisen, dass E2 die Produktion von ATP in hippocampalen Neuronen erhöht.⁶⁶ In mitochondrialen Proteomanalysen wurde deutlich, dass E2 Schlüsselenzyme im kardialen Metabolismus, wie zum Beispiel die Pyruvatdehydrogenase und die ATP-Synthase, regulieren kann. Die durch E2 hervorgerufenen Veränderungen in der Proteinexpression betrafen auch Enzyme der Atmungskette und führten somit zu einer erhöhten mitochondrialen Respiration.⁶⁷

Auch Irwin et al. untersuchten die Effekte von E2 auf die mitochondriale Funktion im Gehirn und kombinierten dabei Respirationmessungen zur Untersuchung der Atmungskettenaktivität mit Proteinexpressionsanalysen. Für die isolierten Mitochondrien aus den Gehirnen ovariectomierter Ratten zeigte sich nach einer 24h *In-vivo*-E2-Behandlung ein Anstieg der State-3-Respiration und des RCI. Die gesteigerte Effizienz der mitochondrialen Respiration war mit einer erhöhten Aktivität und Expression des Komplex IV der Atmungskette verbunden.⁵³

Nilsen et al. konnten die E2-Wirkung zur Neuroprotektivität bestätigen. Sie zeigten, dass eine gesteigerte mitochondriale Respiration ein wichtiger Mechanismus des E2-bedingten Schutzes vor Amyloid-beta-induzierter Apoptose neuronaler Zellen darstellt. Der Sauerstoffverbrauch der State-3-Atmung war für die isolierten Mitochondrien aus den Gehirnen der mit E2 behandelten ovariectomierten Ratten signifikant höher im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren.⁵²

Neben der gesteigerten mitochondrialen Respiration konnten auch Nilsen et al. in Übereinstimmung mit früheren Studien eine durch E2 gesteigerte Aktivität des Komplex IV der Atmungskette nachweisen. Sie zeigten, dass die erhöhte COX-Aktivität mit einer gesteigerten mRNA-Expression der COX-Untereinheiten I-IV einhergeht. Sowohl die Genexpression der mitochondrial kodierten Untereinheiten

I-III als auch die der nukleär kodierten Untereinheit IV waren signifikant erhöht. Ferner führte E2 zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression der ATP-Synthase-Untereinheiten F1 α und F1 β . Dieses Ergebnis stimmt mit der von Brinton et al. beobachteten erhöhten ATP-Produktion in primären Neuronen überein.⁶⁷

Bisher wurden keine vergleichbaren Studien zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im kardialen Gewebe nach E2-Behandlung durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse in der vorliegenden Untersuchung lassen auf einen vergleichbaren positiven E2-Effekt auf die mitochondriale Respiration im Herzgewebe schließen, dessen exakter Mechanismus jedoch detaillierterer Untersuchungen bedarf.

5.3 Einfluss von ER-spezifischen Agonisten auf die mitochondriale Respiration

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der beiden ER-Subtypen in der Regulation der mitochondrialen Respiration näher untersucht. Die einmalige *In-vivo*-Dosis des ER β -Agonisten Compound A führte in weiblichen und männlichen Tieren sowohl nach 5h als auch nach 24h zu einer signifikant erhöhten State-3-Atmung. Die Stimulation des ER α mit PPT hatte nach 5h nur in den männlichen Tieren erhöhte Respirationsraten zur Folge, nach 24h zeigte sich in beiden Geschlechtern kein Effekt von PPT auf die mitochondriale Respiration.

Aktuelle Befunde aus dem eigenen Labor in einem Myokardinfarkt (MI)- Tiermodell mit kardiomyozytenspezifischer ER α -Überexpression zeigten, dass nach Induktion eines MI die mitochondriale Respiration zwischen den Genotypen und den Geschlechtern unterschiedlich ist.⁸⁵ In den männlichen Wildtypmäußen wurde im Gegensatz zu den weiblichen Wildtypmäußen nach MI eine signifikante Abnahme der State-3-Atmung im infarktfernen Gewebe gemessen. Die ER α -Überexpression führte nur in den männlichen Mäußen zum Erhalt der State-3-Atmung in *skinned fibers* aus infarktfernem Gewebe.⁸⁵ Diese Resultate bestätigen die eigenen Ergebnisse dahingehend, dass die Rolle von ER α in der mitochondrialen Respiration geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist.

Demgegenüber zeigen die Ergebnisse der Respirationsmessungen, dass ER β die E2-Effekte auf die kardiale mitochondriale Atmung in beiden Geschlechtern vermitteln kann.

Irwin et al. konnten für isolierte Mitochondrien aus Gehirnen ovariectomierter Ratten nachweisen, dass sowohl eine Stimulierung von ER α als auch von ER β durch die selektiven Agonisten PPT und DPN zu einer gesteigerten mitochondrialen Funktion führt. Beide ER-Agonisten bewirkten nach einer 24h-Behandlung eine signifikant erhöhte mitochondriale Respiration.⁶⁸ Diese unterschiedlichen Resultate lassen den Schluss zu, dass sich die Wirkung von E2/ER α im Gehirn von der im Herzen unterscheidet. Beide ER konnten in den Mitochondrien aus Herz und Gehirn nachgewiesen werden.⁶⁹ Jedoch kann eine unterschiedliche Expression der ER in verschiedenen Geweben eine veränderte Wirkung der ER verursachen. Darüber hinaus existieren für beide ER-Subtypen eine Vielzahl von Isoformen in den verschiedenen Geweben, die durch alternatives Splicing der mRNA entstehen.

So konnten beispielsweise Cammarata et al. für den humanen ER β zeigen, dass neben der Wildtyp-Form (ER β 1) noch vier verschiedene Splice-Varianten (ER β 2-5) in humanen Linsenepithelzellen exprimiert sind, die sich in ihrer subzellulären Verteilung unterscheiden. ER β 1 wurde vorwiegend in den Mitochondrien aber auch im Nukleus nachgewiesen, wohingegen die Isoform ER β 2 nur im Zytosol in Assoziation zum Nukleus exprimiert war.⁷⁰

Auch die Transkription des ER α wird zell- und gewebespezifisch reguliert und führt somit zu einer unterschiedlichen Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien.^{71,72} Für ER α wurden insbesondere im Gehirn zahlreiche Splice-Varianten nachgewiesen, die in verschiedenen Hirnarealen unterschiedlich exprimiert sind.⁷³ Zusätzlich wird die Transkriptionsaktivität des ER α -Gens von gewebespezifisch unterschiedlichen Promotoren reguliert.⁷⁴ Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren bekannt, die mit den unterschiedlichen Promotoren interagieren und so verschiedene Funktionen des ER α aktivieren oder inhibieren können.^{75,76}

Die unterschiedliche subzelluläre Verteilung der ER-Isoformen in den verschiedenen Geweben hat einen Einfluss auf die Regulation und Funktion des ER-Signalsystems⁶⁹ und kann somit auch unterschiedliche E2-Effekte erklären.

Bisher konnte die genaue Funktion der mRNA-Splicevarianten in den unterschiedlichen Geweben wie zum Beispiel im Herzen oder im Gehirn noch nicht bestimmt werden, da diese ER-Isoformen häufig mit der Wildtyp-Form ko-exprimiert sind.⁷⁷

In früheren Studien wurde deutlich, dass im Allgemeinen gewebespezifische Effekte von E2 und ER-Agonisten zum Teil durch spezifische Konformationsänderungen der ER determiniert werden. Dadurch kommt es zur zellspezifischen Assoziation von Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren, sodass unterschiedliche E2-Wirkungen resultieren.^{24,78,79}

Alle oben genannten Faktoren können die unterschiedliche Wirkung des ER α -Agonisten PPT auf die mitochondriale Respiration im Herzen im Vergleich zum Gehirn erklären, jedoch wurden die genauen molekularen Mechanismen der E2-Wirkung und die spezifische Rollenverteilung der ER in den Mitochondrien aus Herz und Gehirn noch nicht untersucht. Im Vergleich zur Studie von Irwin et al. erbrachten die eigenen Respirationmessungen für kardiale Mitochondrien zusätzlich den Nachweis, dass bereits eine 5h-Behandlung mit einem ER β -Agonisten die State-3-Atmung signifikant erhöhen kann. Dies lässt darauf schließen, dass zu beiden Versuchszeitpunkten ER β die E2-Effekte auf die oxidative Phosphorylierung über den klassischen genomischen Signalweg vermitteln könnte.

5.4 Molekulare Mechanismen der E2-Wirkung

In der vorliegenden Studie wurden neben den Respirationmessungen keine weiteren Untersuchungen zu molekularen Wirkmechanismen von E2 auf die Atmungskette durchgeführt.

Aus den genannten Studien von Brinton et al., Nielsen et al. sowie Irwin et al. zur Rolle von E2 in zerebralen Mitochondrien wurde deutlich, dass E2 die Kapazität der OxPhos durch Veränderung der Proteinexpression sowohl nukleär als auch mitochondrial kodierter Proteine der Atmungskette steigern kann. Die Mehrzahl der Proteine der Atmungskette wird durch nukleäre DNA kodiert, die nach der Proteinsynthese an Ribosomen in die Mitochondrien transportiert werden und sich dort mit den 13 mitochondrial kodierten Proteinen zu den fünf Komplexen der Atmungskette vereinen. Daher ist die Koordination der Expression nukleärer und

mitochondrialer Gene wichtig, um die normale mitochondriale Funktion aufrechtzuerhalten.⁶⁹ E2 kann diese Interaktionen zwischen den beiden Gensystemen koordinieren und auf diese Weise die mitochondriale Respiration regulieren.⁴⁷ An der Vermittlung der E2/ER-Effekte auf die Expression nukleär und mitochondrial kodierter Proteine sind eine Reihe von Transkriptionsfaktoren beteiligt.

Die nukleären Respirationsfaktoren 1 und 2 (NRF-1 und NRF-2) spielen eine zentrale Rolle in der Koordination der Transkription nukleärer und mitochondrialer Gene. Sie regulieren die Transkription nukleär kodierter mitochondrialer Proteine, wie der Mehrzahl der Proteine der Atmungskette und der mitochondrialen Transkriptionsfaktoren Tfam, TFB1M und TFB2M, die ihrerseits die Transkription von mitochondrialer DNA kontrollieren.⁸⁰ Stirone et al. bewiesen erstmalig den Einfluss von E2 auf die Transkription von NRF-1. Die Langzeitbehandlung ovariectomierter weiblicher Ratten mit E2 führte zu einem Anstieg der Expression von NRF-1 in zerebralen Blutgefäßen.⁵⁰

Mattingly et al. erbrachten für eine Brust- und Lungenkrebszelllinie den Nachweis, dass E2 die mRNA-Expression von NRF-1 erhöht und dies ein direkter genomischer Effekt der ER ist. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass im Promoter des NRF-1 Gens ein E2-responsives Element (ERE) enthalten ist, welches ER α und ER β binden kann. Der durch E2 induzierte Anstieg von NRF-1 führte zur erhöhten Transkription von Tfam. Daraus folgte eine gesteigerte Transkription von mitochondrialen Zielgenen, wie der Untereinheit I der COX und der NADH-Dehydrogenase. Der durch E2 stimulierte Tfam führte auch zu einer gesteigerten mitochondrialen Replikation. Somit wurde der Nachweis erbracht, dass E2 einen direkten Einfluss auf die mitochondriale Biogenese ausübt.⁸¹

Die Studie von Mattingly et al. zeigte einen molekularen Mechanismus auf, der die Erhöhung der mitochondrialen Aktivität durch E2 erklären kann. Auch im Herzen ist ein vergleichbarer Mechanismus der E2-Wirkung denkbar. Sowohl die Ergebnisse der *Ex-vivo*-Studie als auch der *In-vivo*-Studie nach 5h und 24h Behandlungszeit lassen auf einen genomischen Langzeiteffekt von E2/ER schließen, der die Kapazität der Oxidativen Phosphorylierung steigert.

5.5 Hypothetisches Modell

Auf Grundlage der bereits nachgewiesenen molekularen Mechanismen wurde ein hypothetisches Modell zur Wirkungsweise von E2/ER auf die kardiale mitochondriale Respiration entwickelt. Abbildung 30 gibt eine Übersicht über vier mögliche Signalwege von E2/ER, die eine gesteigerte Kapazität der OxPhos in kardialen Mitochondrien bewirken können.

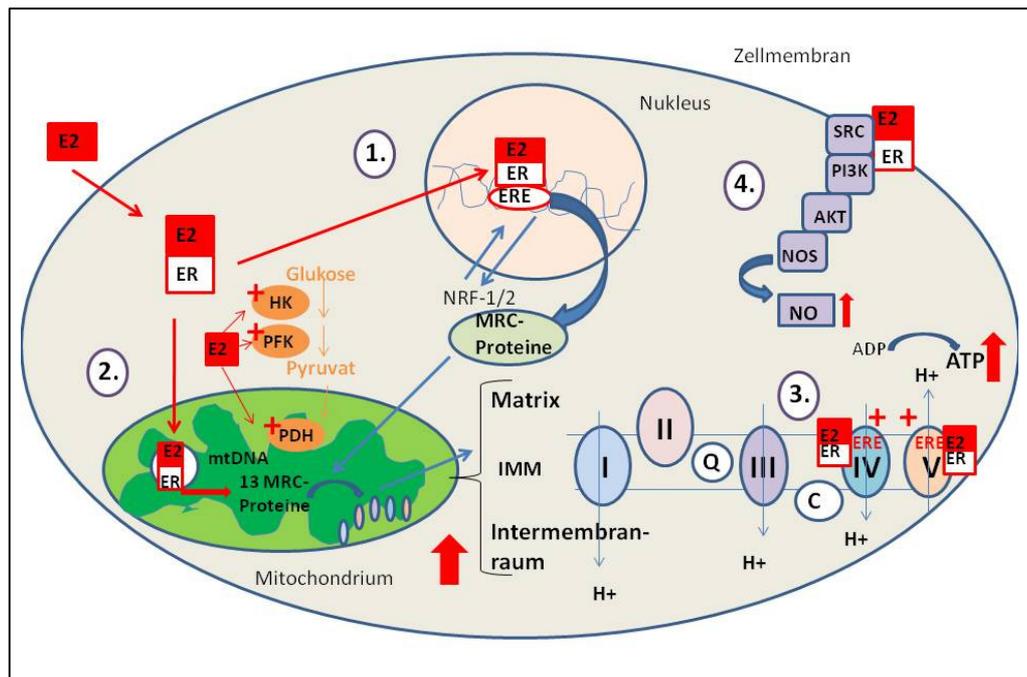


Abbildung 30: Hypothetisches Modell zur Wirkungsweise von E2/ER auf die kardiale mitochondriale Respiration.

1.) E2/ER bindet im Nucleus an ERE der DNA und führt zur Transkription mitochondrialer Proteine. 2.) E2 bindet an mitochondriale ER und steigert die Transkription der mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette. 3.) direkter nicht genomischer E2-Effekt: E2/ER binden direkt an ERE der Atmungskettenkomplexe IV und V. 4.) indirekter nicht genomischer E2-Effekt: E2/ER aktiviert die NOS-Signalkaskade. **MRC** = mitochondrial respiratory chain = mitochondriale Atmungskette; **HK** = Hexokinase; **PFK** = Phosphofruktokinase; **PDH** = Pyruvatdehydrogenase; **Q** = Ubichinon; **C** = Cytochrom C.

1. Der E2/ER-Komplex bindet im Nucleus an ERE der DNA und kann so die Transkription zahlreicher mitochondrialer Proteine stimulieren. Im Nucleus wird durch den E2/ER-Komplex die Transkription von NRF-1 und NRF-2 gesteigert, die ihrerseits die Expression von nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen stimulieren. Dabei handelt es sich um an der Replikation, Transkription und Translation von mitochondrialer DNA beteiligte Proteine, um Proteine der Atmungskette und um mitochondriale Transportproteine. Nach ihrer Synthese an den zytosolischen Ribosomen werden diese in die Mitochondrien transportiert.

2. E2 bindet ebenso an die ER in den Mitochondrien und verstärkt die Bindung an die ERE der mtDNA. E2/ER bildet mit mitochondrialen Transkriptionsfaktoren einen Komplex, der die Transkription von mtDNA steigert. Aus der mitochondrialen mRNA werden mithilfe von Proteinfaktoren die 13 mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette translatiert, die sich mit den nukleär kodierten Proteinen zu den fünf Komplexen der Elektronentransportkette vereinen.
3. Auch ein direkter, nicht-genomisch vermittelter E2-Effekt auf die Komplexe IV und V der Atmungskette ist aufgrund des Nachweises von ERE an diesen Komplexen als wahrscheinlich anzusehen.^{41,42} Möglicherweise bewirkt der E2/ER-Komplex nach Bindung an die ERE der Atmungskettenkomplexe eine durch Phosphorylierung gesteigerte Proteinaktivität. Der genaue Mechanismus dieses Effektes wurde bislang nicht geklärt.
4. Nach Bindung von E2 an membranassoziierte ER wird die Tyrosinkinase SRC stimuliert, welche die NOS-Signalkaskade aktiviert. Die gesteigerte NO-Produktion bewirkt eine Vasodilatation. Dieser nicht-genomische Effekt kann indirekt über eine verbesserte Durchblutung und somit einer erhöhten Substratbereitstellung zu einer gesteigerten Aktivität der OxPhos führen.

Neben der gesteigerten Transkription von Proteinen der Atmungskette kann E2 auch die Expression von metabolischen Schlüsselenzymen, wie PDH und ATP-Synthase, erhöhen⁸². Auch die Expression der Regulationsenzyme der Glykolyse, Hexokinase (HK) und Phosphofruktokinase (PFK), kann E2-abhängig gesteigert werden.⁸³ In der Folge resultiert eine erhöhte Glukoseoxidation. Dies ist ein weiterer indirekter Effekt von E2 auf die mitochondriale Atmung, da das erhöhte Substratangebot zu einer gesteigerten Aktivität der OxPhos führt.

Zusätzlich verdeutlicht die vorliegende Studie die besondere Rolle des ER β in der Vermittlung der E2-Effekte auf die mitochondriale Respiration im Herzgewebe. In einem Trauma-Hämorrhagie-Modell an männlichen Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass E2 und der ER β -Agonist DPN die mitochondriale Biogenese über eine verstärkte Expression des ER β in den Mitochondrien steigern können. Der durch E2 oder DPN aktivierte ER β steigerte auch die COX-Aktivität.⁸⁴

Alle oben beschriebenen Signalwege können an der Vermittlung der E2-Effekte auf die OxPhos im Herzen beteiligt sein. Die genomischen E2-Effekte, die zu einer veränderten nukleären und mitochondrialen Genexpression führen, scheinen die

wichtigsten molekularen Mechanismen zu sein und werden möglicherweise im Herzen vorwiegend über ER β vermittelt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war durch respirometrische Messungen einen Einfluss von E2 auf die mitochondriale Respiration nachzuweisen. Detaillierte Untersuchungen zu möglichen Signalwegen von E2/ER, die eine gesteigerte Kapazität der OxPhos hervorrufen, bleiben weiteren Studien vorbehalten.

5.6 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Studie konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass E2 die mitochondriale Atmungskapazität in kardialen *skinned fibers* steigern kann.

In der *Ex-vivo*-Versuchsreihe zeigte sich nach E2-Langzeitbehandlung für 24h und 48h eine signifikant erhöhte State-3-Respiration in beiden Geschlechtern. Diese Ergebnisse konnten in der *In-vivo*-E2-Studie bestätigt werden. Sowohl nach 5h als auch nach 24h war der Sauerstoffverbrauch in den mit E2 behandelten Tieren höher im Vergleich zu den Kontrollen. Dabei zeigte sich ein Geschlechterunterschied der E2-Wirkung auf die Respirationsraten zu beiden Versuchszeitpunkten, die mit dem endogenen E2-Spiegel der weiblichen Tiere erklärt werden können.

E2 hatte keinen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch der Succinat-Atmung, was darauf schließen lässt, dass die E2-Wirkung auf die kardiale OxPhos über den Komplex I vermittelt wird.

Die *In-vivo*-Behandlung mit einem ER β -Agonisten konnte die E2-Effekte nach 5h und 24h in beiden Geschlechtern reproduzieren. Im Gegensatz dazu führte die PPT-Behandlung nicht zu vergleichbaren Effekten. Dies lässt darauf schließen, dass ER β bei der Vermittlung der E2-Effekte auf die OxPhos im Herzen eine entscheidene Rolle spielt und diese Effekte hauptsächlich über diesen Rezeptor reguliert werden.

5.7 Methodendiskussion und Limitationen

Zur funktionellen Untersuchung der oxidativen Phosphorylierung in kardialen Mitochondrien wurden respirometrische Messungen mit kardialen *skinned fibers* in einem Oxygraphen durchgeführt.

Die Untersuchung der Mitochondrienfunktion in intakten Zellen ist wegen der fehlenden Permeabilität der Zellmembran für die Substrate der oxidativen Phosphorylierung nicht durchführbar. Aus diesem Grund muss der Zugang zu den Mitochondrien geschaffen werden, was auf diversen Wegen möglich ist. Das vielfach angewandte Verfahren der Mitochondrienisolierung weist verschiedene Nachteile auf. Zunächst ist, bedingt durch unvermeidbare Präparationsverluste, eine große Gewebemenge für die Untersuchung erforderlich. Weiterhin besteht das Risiko der präparationsbedingten Auswahl einzelner Mitochondrien-Subpopulationen, die sich in ihren Eigenschaften und Funktion unterscheiden können.⁵⁵

Ein wesentlicher Vorteil der hier angewandten *Skinned-fiber*-Technik ist die wegen der fehlenden Präparationsverluste deutlich höhere Empfindlichkeit. Kunz et al. konnten nachweisen, dass etwa 90 % der in der Zelle vorhandenen Mitochondrien im Versuchsansatz für die Respirationsmessung zur Verfügung standen.⁵⁸

Die Mitochondrien verbleiben in ihrer physiologischen Umgebung, wodurch ihre Intaktheit gewährleistet werden kann. Dies konnte durch die Zugabe von Cytochrom C während der Messungen gesichert werden.

Durch die Messergebnisse der basalen Respiration konnten zudem die Zuverlässigkeit der Methode und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nachgewiesen werden. Entsprechend stellt sich die *Skinned-fiber*-Technik als geeignete Methode zur Durchführung von respiratorischen Messungen kardialer Mitochondrien dar.

In den *In-vivo*-Versuchsreihen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weibliche und männliche Wildtypmäuse verwendet. Im Gegensatz zu den vergleichbaren E2-Studien im Gehirn wurden die weiblichen Tiere vor der E2- oder ER-Agonisten-Behandlung keiner Ovariectomie unterzogen. Daher konnte der zusätzliche Einfluss des endogenen E2 auf die Regulation der mitochondrialen Respiration in den weiblichen Tieren nicht unterdrückt werden. Da in der basalen Respiration jedoch keine Geschlechterunterschiede feststellbar waren und in den *In-vivo*-Versuchen in beiden Geschlechtern erhöhte Respirationsraten mit E2 und dem ER β -Agonisten gemessen werden konnten, sind die E2-Effekte auf die State-3-Atmung auf das exogene E2 zurückzuführen.

Zur Untersuchung der ER-Subtypen in der Regulation der OxPhos wurden die *In-vivo*-Versuchsreihen mit selektiven ER-Agonisten durchgeführt. Durch die zusätzliche Verwendung von spezifischen ER α - bzw. ER β -Antagonisten und nachfolgende gezielte Stimulierung des anderen ER hätte eine genauere Analyse zur Funktion der ER in der mitochondrialen Respiration erzielt werden können.

In der *In-vivo*-Studie hätte durch die Messung der E2-Serumspiegel der Tiere der Nachweis für eine erhöhte E2-Aktivität erbracht werden sollen. Jedoch sind für die derzeit verfügbaren Messmethoden die gewonnenen Blut- bzw. Serummengen aus Mäusen nicht ausreichend, um reproduzierbare Messwerte zu erhalten.

5.8 Ausblick

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten den Einfluss von E2 auf den kardialen Energiemetabolismus bestätigen. Demnach lassen sich die beobachteten Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung einer MH, die im klinischen Alltag auftreten und in den Tiermodellen bestätigt wurden, teilweise auf Unterschiede in der Regulation der mitochondrialen Respiration zwischen den Geschlechtern zurückführen.

Weiterführende Untersuchungen zur Wirkung von E2 und den ER-Agonisten in einem MH-Tiermodell würden die E2-Effekte auf die mitochondriale Atmungskapazität unter pathologischen Bedingungen nachweisen.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, die in dem aufgezeigten hypothetischen Modell postulierten Wirkungsmechanismen von E2 auf die kardiale OxPhos im Einzelnen zu analysieren. Dazu müsste zum Beispiel die Proteinexpression der Komplexe der Atmungskette vor und nach E2-Stimulation mittels Western-Blot gemessen werden, um den Nachweis zu erbringen, dass auch am Herzen die Komplexe IV und V der Atmungskette E2-abhängig reguliert werden. Als direkter Nachweis für einen molekularen Wirkmechanismus von E2 müsste gezielt ein Signalweg im Tierversuch geblockt werden.

Die Kenntnis der Wirkmechanismen von E2 und ER-Agonisten ist die Voraussetzung für einen eventuellen therapeutischen Einsatz entsprechender Wirkstoffe in Prophylaxe und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen.

Literaturverzeichnis

1. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937–52.
2. Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25-146.
3. Thom T, Haase N, Rosamond W, et al. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006;113:e85-151.
4. Silber DH. Heart failure in women. *Curr Womens Health Rep* 2003;3:104–9.
5. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:425–38.
6. Fox CS, Yang Q, Cupples LA, et al. Sex-specific association between estrogen receptor-alpha gene variation and measures of adiposity: the Framingham Heart Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:6257–62.
7. Cleland JGF, Swedberg K, Follath F, 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;24:442–63.
8. Krumholz HM, Larson M, Levy D. Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am. J. Cardiol.* 1993;72:310–3.
9. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, et al. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;288:H469-76.
10. Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998;32:1118–25.
11. Babiker FA, Lips D, Meyer R, et al. Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:1524–30.
12. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, 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:R1597-606.

13. Wagner RA, Tabibiazar R, Powers J, Bernstein D, Quertermous T. Genome-wide expression profiling of a cardiac pressure overload model identifies major metabolic and signaling pathway responses. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004;37:1159–70.
14. Mirotsov M, Dzau VJ, Pratt RE, Weinberg EO. Physiological genomics of cardiac disease: quantitative relationships between gene expression and left ventricular hypertrophy. *Physiol. Genomics* 2006;27:86–94.
15. Weinberg EO, Mirotsov M, Gannon J, Dzau VJ, Lee RT, Pratt RE. Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload. *Physiol. Genomics* 2003;12:113–27.
16. Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B. The role of sex in cardiac function and disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006;84:93–109.
17. Burger HG. Physiological principles of endocrine replacement: estrogen. *Horm. Res.* 2001;56 Suppl 1:82–5.
18. Grohé C, Kahlert S, Löbbert K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* 1997;416:107–12.
19. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, et al. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation* 2004;110:3270–5.
20. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, et al. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J.* 2006;20:926–34.
21. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:5925–30.
22. Walter P, Green S, Greene G, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985;82:7889–93.
23. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:1801–11.
24. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997;389:753–8.
25. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 2005;67:335–76.
26. Shibata H, Spencer TE, Onate SA, et al. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res* 1997;52:141-64; discussion 164-5.

27. Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 1994;264:1455–8.
28. Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors α and β . *J. Biol. Chem.* 2005;280:19704–10.
29. Du G, Zhou L, Chen X, Wan X, He Y. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative and invasive effects induced by hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;420:343–9.
30. Buitrago C, Massheimer V, Boland AR de. Acute modulation of Ca^{2+} influx on rat heart by 17 β -estradiol. *Cell. Signal.* 2000;12:47–52.
31. Smith CL, Conneely OM, O'Malley BW. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:6120–4.
32. Ciana P, Ravisconi M, Mussi P, et al. In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors. *Nat. Med.* 2003;9:82–6.
33. Dubey RK, Tofovic SP, Jackson EK. Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;308:403–9.
34. Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J. Clin. Invest.* 2005;115:547–55.
35. BING RJ, SIEGEL A, UNGAR I, GILBERT M. Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am. J. Med.* 1954;16:504–15.
36. Neely JR, Rovetto MJ, Oram JF. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog Cardiovasc Dis* 1972;15:289–329.
37. Scolletta S, Biagioli B. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomed Pharmacother* 2010;64:203–7.
38. Bauer C, Klinke R. *Physiologie*. 5th ed. Stuttgart: Georg Thieme, 2005. Online-Datei. ISBN: 3-13-796005-3.
39. Bellance N, Lestienne P, Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front. Biosci.* 2009;14:4015–34.

40. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007. 1 online resource (xxi, 1263. ISBN: 978-3-540-32680-9.
41. Zheng J, Ramirez VD. Purification and identification of an estrogen binding protein from rat brain: oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), a subunit of mitochondrial F₀F₁-ATP synthase/ATPase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;68:65–75.
42. Zheng J, Ramirez VD. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F₀F₁-ATPase activity by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺ -ATPase of porcine cortex. *Eur J Pharmacol* 1999;368:95–102.
43. Psarra AG, Sekeris CE. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life* 2008;60:210–23.
44. Monje P, Boland R. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J. Cell. Biochem.* 2001;82:467–79.
45. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004;286:E1011-22.
46. Yang S, Liu R, Perez EJ, et al. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101:4130–5.
47. Duckles SP, Krause DN, Stirone C, Procaccio V. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol. Interv.* 2006;6:26–35.
48. Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, Yager JD. Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J. Cell. Biochem.* 2004;93:358–73.
49. Chen J, Brown TR, Yager JD. Mechanisms of hormone carcinogenesis: evolution of views, role of mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008;630:1–18.
50. Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.* 2005;68:959–65.
51. Chen J, Russo PA, Cooke C, Russo IH, Russo J. ERbeta shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1732–46.

52. Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci* 2006;7:74.
53. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 2008;149:3167–75.
54. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim. Biophys. Acta* 1987;892:191–6.
55. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965–76.
56. Walker D. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Sheffield: Research Institute for Photosynthesis, University of Sheffield, 1987. 145 p. ISBN: 9781870232005.
57. Stuart JA, Brindle KM, Harper JA, Brand MD. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr* 1999;31:517–25.
58. Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, et al. Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim. Biophys. Acta* 1993;1144:46–53.
59. Sanz A, Hiona A, Kujoth GC, et al. Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp. Gerontol.* 2007;42:173–82.
60. Rodriguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, et al. Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 2002;277:42958–63.
61. Quevedo S, Roca P, Picó C, Palou A. Sex-associated differences in cold-induced UCP1 synthesis in rodent brown adipose tissue. *Pflugers Arch.* 1998;436:689–95.
62. Roca P, Rodriguez AM, Oliver P, et al. Brown adipose tissue response to cafeteria diet-feeding involves induction of the UCP2 gene and is impaired in female rats as compared to males. *Pflugers Arch.* 1999;438:628–34.
63. Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J, Gianotti M. Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2005;289:C372-8.

-
64. Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, et al. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1998;102:1083–91.
65. Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, Davey CL, Radda GK, Clarke K. Gender differences in hypertrophy, insulin resistance and ischemic injury in the aging type 2 diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004;37:547–55.
66. Brinton RD, Chen S, Montoya M, Hsieh D, Minaya J. The estrogen replacement therapy of the Women's Health Initiative promotes the cellular mechanisms of memory and neuronal survival in neurons vulnerable to Alzheimer's disease. *Maturitas* 2000;34 Suppl 2:S35-52.
67. Nilsen J, Irwin RW, Gallaher TK, Brinton RD. Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *J. Neurosci.* 2007;27:14069–77.
68. Irwin RW, Yao J, To J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *J. Neuroendocrinol.* 2012;24:236–48.
69. Chen J, Cammarata PR, Baines CP, Yager JD. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;1793:1540–70.
70. Cammarata PR, Flynn J, Gottipati S, et al. Differential expression and comparative subcellular localization of estrogen receptor beta isoforms in virally transformed and normal cultured human lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 2005;81:165–75.
71. Shupnik MA, Pitt LK, Soh AY, Anderson A, Lopes MB, Laws ER JR. Selective expression of estrogen receptor alpha and beta isoforms in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3965–72.
72. Freyschuss B, Sahlin L, Masironi B, Eriksson H. The hormonal regulation of the oestrogen receptor in rat liver: an interplay involving growth hormone, thyroid hormones and glucocorticoids. *J Endocrinol* 1994;142:285–98.
73. Ishunina TA, Swaab DF. Estrogen receptor-alpha splice variants in the human brain. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:93–8.
74. Flouriot G. Differentially Expressed Messenger RNA Isoforms of the Human Estrogen Receptor- Gene Are Generated by Alternative Splicing and Promoter Usage. *Molecular Endocrinology* 1998;12:1939–54.

75. Schuur ER, McPherson LA, Yang GP, Weigel RJ. Genomic structure of the promoters of the human estrogen receptor-alpha gene demonstrate changes in chromatin structure induced by AP2gamma. *J. Biol. Chem.* 2001;276:15519–26.
76. Tanimoto K, Eguchi H, Yoshida T, Hajiro-Nakanishi K, Hayashi S. Regulation of estrogen receptor alpha gene mediated by promoter B responsible for its enhanced expression in human breast cancer. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:903–9.
77. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561–70.
78. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998;95:927–37.
79. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.* 1999;18:4608–18.
80. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1147:321–34.
81. Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Barch MJ, Klinge CM. Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol. Endocrinol.* 2008;22:609–22.
82. Brinton RD. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends Neurosci.* 2008;31:529–37.
83. Kostanyan A, Nazaryan K. Rat brain glycolysis regulation by estradiol-17 beta. *Biochim. Biophys. Acta* 1992;1133:301–6.
84. Hsieh Y, Yu H, Suzuki T, et al. Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006;41:511–21.
85. Leber J. Dissertation in Arbeit, Institut Gender in Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin 2012, unveröffentlichte Ergebnisse.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Julia Jost, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Einfluss von Östrogen und Östrogen-Rezeptoren auf die kardiale Mitochondrienfunktion

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Fliegner D, Jost J, Ventura-Clapier R, Bugger H, Regitz-Zagrosek V. Estrogen and ER β agonist increase cardiac mitochondrial respiration. (in preparation)

Kongressbeiträge- Poster und Vorträge

Fliegner D, Jost J, Bugger, H, Ventura-Clapier R, Regitz-Zagrosek V. Effects of estrogen and estrogen receptors on cardiac and skeletal muscle mitochondrial function. Vortrag ECCR-Meeting, Nizza, September 2011.

Fliegner D, Jost J, Bugger, H, Ventura-Clapier R, Regitz-Zagrosek V. Estrogen and estrogen receptors modulate the mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. Posterbeitrag Mannheim 78. Jahrestagung, April 2012.

Fliegner D, Jost J, Bugger, H, Ventura-Clapier R, Regitz-Zagrosek V. Estrogen and estrogen receptors modulate the mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. Posterbeitrag FCVB, London, April 2012.

Fliegner D, Jost J, Bugger, H, Ventura-Clapier R, Regitz-Zagrosek V. Enhancement of cardiac mitochondrial function by estrogen and estrogen receptors. Posterbeitrag Keystone Symposia, Colorado, USA, Februar 2013.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek möchte ich für die Überlassung des Themas und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft danken. Des Weiteren danke ich ihr für die Möglichkeit, meine Ergebnisse im Rahmen eines internationalen Kongresses präsentieren zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Daniela Fliegner, die meine Arbeit von Anfang bis Ende mit großem Engagement betreut hat. Auch während deinen eigenen Laborarbeiten in Wuppertal hattest du immer ein offenes Ohr für mich. Durch deine konstruktiven Anmerkungen wurde die Fertigstellung der Arbeit immer wieder vorangetrieben.

Frau Dr. Carola Schubert danke ich dafür, dass sie mir bei allen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Großer Dank an Vanessa, die mich bei der praktischen Arbeit im Labor unterstützt hat und mit der ich einige lustige Laborabende verbrachte.

Anja Angelov danke ich für die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit.

Allen anderen Mitgliedern der AG Regitz-Zagrosek danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Großmutter bedanken, die mich zu jeder Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben. Meinem Bruder danke ich für seine vielen motivierenden Worte.