

Aus dem Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM),  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression, Lokalisation und Funktion myokardialer  
Östrogenrezeptoren im humanen linksventrikulären Myokard und im  
Tiermodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Maria Nordmeyer, geb. Eder  
aus Berlin



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

**2. Prof. Dr. med. G. Schönfelder**

**3. Prof. Dr. K. Brixius**

**Datum der Promotion: 16.05.2010**



---

## **Inhalt**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	6
<b>1. Abstract</b>	8
<b>2. Einleitung und Zielsetzung</b>	10
<b>3. Material und Methoden</b>	12
3.1 Patienten	12
3.2 Tiermodell	12
3.3 Hämodynamische Evaluation	13
3.4 Morphometrische Analyse der adulten murinen Kardiomyozyten	13
3.5 Zellkultur und Transfektion von Ventrikelmyozyten neonataler Ratten	14
3.6 Luziferase Assay	15
3.7 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion	15
3.8 Western Blot	15
3.9 Immunhistochemie	16
3.10 Immunopräzipitation	16
3.11 Statistik	17
<b>4. Ergebnisse</b>	18
4.1 ER-Expression in humanen LV-Myokardproben	18
4.2 Lokalisation und Interaktion von ER in humanen LV-Myokardproben	21
4.3 Funktion von E2 in vivo und in vitro	29
<b>5. Diskussion</b>	36
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	41
<b>7. Ausgewählte Publikationen und Anteilserklärung</b>	46
<b>8. Anhang</b>	47
8.1 Lebenslauf	47
8.2 Publikationsliste	48
8.3 Eidstattliche Erklärung	49
8.4 Danksagung	50

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aortenklappenstenose
Beta-MHC	Beta-Myosin-Schwerkette
BNP	„brain natriuretic peptide“
caCnA	„constitutively active mutant of CnA“
Cn	Calcineurin
CnA	Calcineurin A
Con	Kontrollen
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Östrogenrezeptor(en)
ER alpha	Östrogenrezeptor alpha
ER beta	Östrogenrezeptor beta
E2	17-beta Estradiol
EtOH	Ethanol
Fr	French
FS	„Fractional Shortening“ (englisch für fraktionelle Verkürzungsfraction)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	„green fluorescent protein“
GSK3beta	„Glycogen synthase kinase 3 beta“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ID	„Intercalated disc“ (englisch für Glanzstreifen)
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kalium-Chlorid
LV	linksventrikulär
LV dp/dt	linksventrikuläre Druckänderung pro Zeit = Index für Kontraktilität
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
MDM2	„Mouse Double Minute 2“
MCIP1	„Modulatory Calcineurin Interacting Protein 1“
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium-Chlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mmol	millimol
µl	Mikroliter
µmol	mikromol

(Weiterführung 1 Abkürzungsverzeichnis)

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
μM	mikromolar
μg	Mikrogramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MuRF1	Muskel spezifisches Ringfingerprotein 1
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natrium-Chlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NFAT	„Nuclear factor of activated T-cells“
nM	nanomolar
NRVM	Ventrikelmyozyten neonataler Ratte
ns	nicht signifikant
PE	Phenylephrin
pH	pondus Hydrogenii
RT-PCR	“Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion”
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Nanogramm
Sham	Scheinoperation
TAC	„Transverse Aortic Constriction“
WB	Western Blot

## 1. Abstract

Klinische Studien beschreiben Geschlechterunterschiede bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz, wobei Frauen einen günstigeren klinischen Verlauf der Erkrankungen zeigen. Tierexperimentelle Studien weisen auf kardioprotektive Effekte des weiblichen Geschlechtshormons 17-beta Estradiol (E2) über seine Östrogenrezeptoren (ER) alpha und beta hin. Die Funktion der ER in humanen Herzen und die molekularen Wirkmechanismen der ER sind noch weitgehend unbekannt.

Um die Rolle humaner myokardialer ER zu erforschen, wurden in dieser Arbeit zunächst die Expression und Lokalisation von ER in linksventrikulären (LV-) Myokardproben von gesunden und erkrankten (Aortenklappenstenose, AS, und dilatative Kardiomyopathie, DCM) Männern und Frauen untersucht. Anschließend wurde in einem Tiermodell der druckinduzierten LV-Hypertrophie („*Transverse Aortic Constriction*“ (TAC)) und in Zellkulturversuchen eine funktionelle Analyse der antihypertrophen Wirkung von E2 über ER durchgeführt.

Die Untersuchungen zeigten folgende Ergebnisse:

**Expression:** ER mRNA- und Proteingehalt waren in LV-Myokardproben von Patienten mit AS und DCM signifikant erhöht exprimiert. Es bestand eine inverse Korrelation zwischen ER beta mRNA und Calcineurin A (CnA) beta mRNA in LV-Myokardproben von Patienten mit AS. Geschlechterunterschiede zeigten sich in einem signifikant höheren Anstieg der ER beta mRNA-Expression in Herzen von weiblichen Patienten mit AS und einem höheren Anstieg der ER alpha Proteinexpression in Herzen von weiblichen Patienten mit DCM.

**Lokalisation und Interaktion:** ER alpha wurde in LV-Myokardproben von gesunden Herzen in den Zellkernen, an Zellmembranen und Glanzstreifen der Kardiomyozyten, sowie in den Zellkernen von Fibroblasten und Endothelzellen lokalisiert. Zusätzlich zeigte sich eine Kolokalisation von ER alpha und Beta-Catenin an Glanzstreifen der LV-Myokardproben und eine Interaktion beider Proteine in gesunden humanen Herzen. In LV-Myokardproben von Patienten mit AS und DCM hingegen war das ER alpha Signal an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten signifikant reduziert und eine Kolokalisation von ER alpha und Beta-Catenin nicht nachweisbar.

**Antihypertrophe Wirkung:** E2 verminderte druckinduzierte LV-Hypertrophie im Tiermodell. Dabei führte E2 zu einer Verhinderung der Kardiomyozytenhypertrophie und verminderte die Verschlechterung der linksventrikulären systolischen Funktion und Kontraktilität, die im Rahmen der druckinduzierten Hypertrophie entstand. Zellkulturversuche zeigten, daß die antihypertrophe Wirkung von E2 auf Kardiomyozyten einem ER-abhängigen Mechanismus über die Erhöhung der Degradation von Calcineurin (Cn) entspricht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ER in hypertrophierten und dilatierten humanen Herzen signifikant erhöht exprimiert und verändert lokalisiert vorliegen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Im Tiermodell wirkte E2 der druckinduzierten LV-Hypertrophie entgegen und führte zu einer Verringerung der Kardiomyozytenhypertrophie und zu einer Verbesserung der LV-Funktion. In Zellkulturversuchen zeigte sich eine ER-abhängige antihypertrophe Wirkung von E2 durch eine Erhöhung der Degradation von Cn.

Eine erhöhte Expression kardialer ER bei AS und DCM könnte demnach einem der Hypertrophie entgegenwirkenden Kompensationsmechanismus entsprechen. Die Kollokalisierung und Interaktion von ER alpha und Beta-Catenin in gesunden Herzen könnte auf einen funktionellen Protein-Komplex hinweisen, der in hypertrophierten und dilatierten Herzen nicht mehr an Glanzstreifen vorhanden ist.

## 2. Einleitung und Zielsetzung

Geschlechterunterschiede bei der Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen wurden in klinischen und experimentellen Studien beschrieben (1-6). Die myokardiale Druckbelastung, die durch eine Aortenstenose hervorgerufen wird, führt bei Frauen zur Ausbildung einer konzentrischen Hypertrophie mit besser erhaltener LV-Funktion, Männer hingegen entwickeln eine exzentrische Hypertrophie und LV-Dilatation (4, 7-9). Die Prognose für Frauen mit Herzinsuffizienz ist besser und die Mortalität geringer als bei Männern. Die Vermutung, dass Effekte des weiblichen Geschlechtshormons E2 das Auftreten von Geschlechterunterschieden in kardiovaskulären Erkrankungen beeinflusst, konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden (10-13).

E2 wirkt über die Aktivierung zweier Östrogenrezeptoren, ER alpha und beta. Diese gehören zur Familie der Steroidrezeptoren, die sowohl als Transkriptionsfaktoren fungieren (genomische Effekte), als auch nicht-genomische Effekte ausüben (14, 15). Es wurde beschrieben, dass ER im kardiovaskulären System in Zellkernen von Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten und Gefäßendothelzellen von Nagetieren exprimiert und funktionell aktiv sind (16-19). In neuerer Zeit wird zunehmend eine Lokalisation von ER an Plasmamembranen und eine Interaktion von ER mit zytoplasmatischen Proteinen wie Beta-Catenin und GSK3beta in neuronalen und endothelialen Zellen diskutiert (20-22).

Funktionell werden kardiovaskuläre ER *in vivo* und *in vitro* mit der Prävention von Apoptose (12), der Expression antihypertropher Proteine (11) und der Beeinflussung von Zell-Zell Interaktionen assoziiert (22). Van Eickels et al berichteten (23), dass E2 in einem Tiermodell der Aortenstenose die Entwicklung der druckinduzierten LV-Hypertrophie verminderte. Die Rolle der kardialen ER in humanem Myokard hingegen ist weitgehend unerforscht.

Das hypertrophe Wachstum von Kardiomyozyten wird unter anderem durch intrazelluläre Kalziummobilisierung reguliert (24). Ein erhöhter intrazellulärer Kalziumgehalt kann zur Aktivierung der kalziumabhängigen Phosphatase Cn führen, die den Transkriptionsfaktor „*Nuclear factor of activated T-cells*“ (NFAT) dephosphoryliert und dadurch dessen nukleäre Translokation ermöglicht. Die Interaktion von NFAT mit weiteren Transkriptionsfaktoren führt letztlich zur Aktivierung Hypertrophie-fördernder Signalwege (25-31). E2 reduziert die Aktivität von L-Typ-Kalziumkanälen *in vitro* und schützt somit vor erhöhtem intrazellulärem Kalziumgehalt (32). E2 und ER können der kardialen Hypertrophie entgegen wirken, und eine Inhibition des Cn Signalweges könnte dabei eine Rolle spielen (11-13, 23, 33).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression und Lokalisation von ER alpha und beta im humanen LV-Myokard unter Berücksichtigung möglicher krankheits- und geschlechtsabhängiger Unterschiede. Im Tiermodell druckinduzierter Myokardhypertrophie sollte die antihypertrophe Wirkung von E2 auf hämodynamischer, funktioneller und zellmorphologischer Ebene beschrieben werden. In Zellkulturversuchen an Kardiomyozyten von Mäusen und Ratten sollten die ER abhängigen Mechanismen der antihypertrophen Wirkung von E2 über Beeinflussung bekannter Hypertrophie-assoziiierter Signalwege untersucht werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patienten

LV-Myokardproben von Patienten mit AS (n=14; 8 Frauen ( $65.6 \pm 4.5$  Jahre) und 6 Männer ( $67.7 \pm 1.4$  Jahre)) und von gesunden Kontrollen (n=17, 8 Frauen ( $57.4 \pm 2.1$  Jahre) und 9 Männer ( $55.0 \pm 2.5$  Jahre)), sowie von Patienten mit DCM (n=41; 7 Frauen ( $38.1 \pm 8.5$  Jahre) und 34 Männer ( $44.9 \pm 1.6$  Jahre)) und gesunden Kontrollen (n=25; 10 Frauen ( $46.9 \pm 4.8$  Jahre) und 15 Männer ( $43.7 \pm 4.5$  Jahre)) wurden für die mRNA- und Proteinmessungen, die Immunhistochemie und Immunpräzipitation verwendet.

LV-Myokardproben von Patienten mit AS wurden bei elektivem, operativem Aortenklappenersatz gewonnen. Gewebeproben der Kontrollgruppe stammten von nicht verwendeten Spenderherzen für Herztransplantationen. Gewebeproben von Patienten mit DCM wurden bei orthotopen Herztransplantationen entnommen.

#### 3.2 Tiermodell

Experimente wurden mit 8-10 Wochen alten weiblichen Wildtyp Mäusen (n = 88; C57BL/6, Taconic Laboratories, New York), an transgenen Mäusen, welche ubiquitär einen NFAT aktivierten Promotor und Luziferase Reportergen exprimierten (NFAT-Luc Mäuse), und an CnA beta Knockout Mäusen durchgeführt (34).

An Tag -14 (Abbildung 1) wurden alle Mäuse ovariektomiert und erhielten für 7 Tage subkutan platzierte Placebo- oder Östrogen-Tabletten (0.25mg/60 Tage Freisetzungstablette; Innovative Research of America, Sarasota FL). An Tag 0 erhielten die Mäuse entweder eine Scheinoperation (alleiniges Eröffnen und Schließen des Thorax (Sham)) oder TAC-Operation. Somit entstanden 4 Gruppen: Placebo-Sham (n = 13), E2-Sham (n = 13), Placebo-TAC (n = 29) und E2-TAC (n = 33). An Tag 13 erhielten die Wildtyp und NFAT-Luc Mäuse eine echokardiographische Untersuchung, an Tag 14 erfolgte eine hämodynamische Evaluation per Herzkatheter, und danach wurden die Herzen dieser Mäuse extrahiert und für die Zellkulturuntersuchungen weiterverarbeitet (34-36). Bei den Untersuchungen an CnA beta Knockout Mäusen wurde die echokardiographische Untersuchung an Tag 27 und die hämodynamische Evaluation sowie die Extraktion der Herzen an Tag 28 durchgeführt (Abbildung 1).

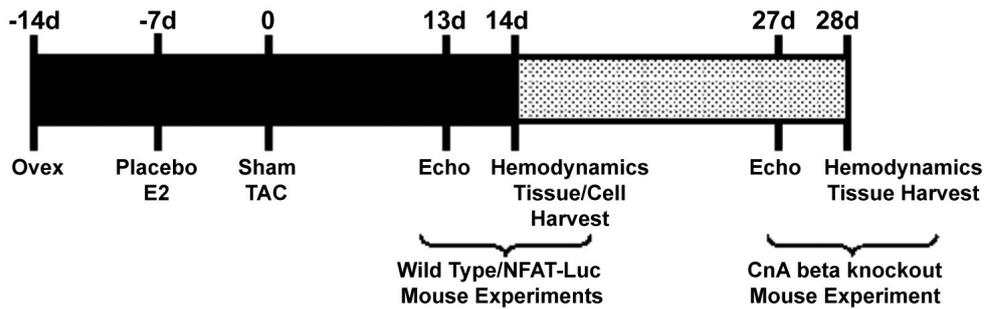


Abbildung 1: Ovex = Ovariectomie, Echo = transthorakales Echokardiogramm, d = Tag, Hemodynamics = Herzkatheteruntersuchung, Tissue/Cell Harvest = Anlegen der Zellkultur und Morphometrie der Zellen (aus ausgewählter Publikation 7. 3), online Figure I).

### 3.3 Hämodynamische Evaluation

Druck-Volumen-Kurven wurden erstellt, indem ein kalibrierter 1.0 French (Fr) Druck-Volumen Conductance-Katheter (PVR-1045, Millar Instruments, Houston Texas) über die rechte Karotisarterie im linken Ventrikel platziert wurde. Die Druckgradienten der TAC operierten Tiere wurden gemessen, indem ein 1.0 Fr Mikrotip Drucktransducer Katheter (Model # SPR-1000, Millar instruments) über die linke Karotisarterie eingeführt wurde und den Aortendruck vor und hinter der Konstriktion abnahm (34, 36-38).

### 3.4 Morphometrische Analyse der adulten murinen Kardiomyozyten

Zwei Wochen nach Sham- oder TAC-Operation (Placebo- und E2-behandelt) wurden die Myozyten der adulten Mäuse (23 Stück) enzymatisch isoliert (39). Der zuletzt verwendete Puffer wurde mit einem Übermaß an KCl (30mM) supplementiert, um spontane Myozytenkontraktionen zu unterdrücken. Die Zellen wurden unverzüglich auf Glasträger gezogen und an einem Olympus BX40 Mikroskop in 100x Vergrößerung analysiert. Nach Kalibrierung wurden Fläche, Länge und Breite von mindestens 100 Myozyten/Herz gemessen, um einen repräsentativen Mittelwert zu erlangen. Alle Messungen erfolgten verblindet.

### 3.5 Zellkultur und Transfektion von Ventrikelmyozyten neonataler Ratten

Für die Anlegung der Zellkulturversuche wurden ein bis zwei Tage alte Sprague-Dawley Ratten euthanasiert, die Herzen extrahiert und die Ventrikel in Pufferlösung zerkleinert (in mmol/l: 116 NaCl, 20 HEPES, 0.8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.6 Glukose, 5.4 KCl, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, pH 7.35, mit 0.6 mg/ml Pankreatin und 0.4 mg/ml Collagenase Typ II) (40). Bei 37 °C erfolgten mehrere Verdauungsvorgänge; die dabei entstandenen Pellets wurden in Zellkulturmedium (Ham's F10) mit 10% Pferdeserum und 5% Kohle-gefiltertem fetalem Kälberserum (100 µmol/l BromoDeoxyuridin, 100 Einheiten/l Penicillin und Streptomycin) gelöst und für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das diente der Adhäsion der Fibroblasten. Der kardiomyozytenreiche Überstand wurde dann mit einer Dichte von  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  auf Zellkulturplatten (BD Falcon) ausgelegt. Die Kardiomyozyten wuchsen für 48 Stunden in serumhaltigem Medium. Danach wurde das Medium durch serumfreies Medium (Dulbecco's modifiziertes Medium (phenolrotfrei)) ausgetauscht. Unter Serumentzug wurden die Zellen zunächst mit dem alpha1-adrenergen Rezeptoragonisten Phenylephrin stimuliert und dann entweder mit E2 (1 oder 10nM E2 gelöst in 0.1% EtOH Solvens-Stammlösung) oder nur mit der Solvens-Stammlösung (0.1%, EtOH) behandelt. In einzelnen Versuchen wurde der ER-Antagonist ICI 182,780 (ICI) (0.5-1µM) entweder allein oder in Kombination mit E2 verwendet.

Weiterführende Stimulationsversuche erfolgten mit dem Calcineurininhibitor Cyclosporin (500ng/ml), dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (40µg/ml) und dem Proteasominhibitor Lactacystin (10µmol/l).

Daraufhin wurden Plasmid-DNA-Transfektionen durchgeführt. Dazu wurde die Calcium Phosphat Methode benutzt (41). 1µg des NFAT-Luziferase Plasmids und 0.5µg der L7-RH Beta-Galaktosidase wurden den 12-Well Platten beim Auslegen der Zellen hinzugefügt.

Für die pCMV5-myc-Ubiquitin Transfektion wurden 7.5µg Plasmid-DNA den Zellkulturplatten (10cm Durchmesser) mit  $2.5 \times 10^6$  Zellen hinzugefügt.

Zur Infektion mit replikationsdefizienten Adenoviren („*constitutively active mutant of CnA*“ (caCnA), „*green fluorescent protein*“ (GFP)) wurden jeder Platte beim Zeitpunkt des Auslegens der Zellen Viren hinzugegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### 3.6 Luziferase Assay

24 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen in Reporter Lysis Puffer (Promega) lysiert und die Luziferase Aktivität gemessen (Luziferase Assay System (Promega)). Die Messung der Beta-Galaktosidase Aktivität wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz herangezogen, und die resultierenden Werte wurden zur Normalisierung der Lumineszenzmessungen verwandt. Außerdem wurden Luziferase Assays an myokardialen Lysaten transgener Mäuse (NFAT-Luc Mäuse) durchgeführt.

### 3.7 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion

RNA wurde aus humanen und murinen LV-Myokardproben sowie Myozyten neonataler und adulter Ratten extrahiert und eine Reverse Transkription durchgeführt. Im Doppelansatz wurde eine „*hot start*“ Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion für ER alpha und beta mit Hybridisierungsproben im Light Cycler Instrument durchgeführt. CnA beta, „*brain natriuretic peptide*“ (BNP), Beta-Myosin-Schwerkette (Beta-MHC), atriales natriuretisches Peptid (ANP) und „*Modulatory Calcineurin Interacting Protein 1.4*“ (MCIP 1.4) wurden im Dreifachansatz am Taqman Instrument mit SYBR green gemessen. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA-Expression wurde mit Hilfe von SYBR green quantifiziert. Der mRNA Gehalt jedes Zielgens wurde in jeder Probe in Bezug auf den mRNA Gehalt von GAPDH normalisiert.

### 3.8 Western Blot

LV-Myokardproben wurden mit LysisMatrix Partikeln und Detergenz Lysispuffer in einem FastPrep Homogenisator (FP 120, Qbiogene) homogenisiert. Der Proteingehalt wurde gemessen (BCA protein assay, Pierce), mit Hilfe eines 10% SDS-Gels aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferriert.

Polyklonale Antikörper gegen den C-terminus von ER alpha (MC-20, Santa Cruz) gerichtet oder monoklonale Antikörper gegen GAPDH (Chemicon) und Beta-Catenin (BD Biosciences) wurden benutzt. Mit ECL Detektionskit (Amersham Pharmacia Biotech) wurden die Signale sichtbar gemacht und mit Alpha Ease FC (software, version 3.1.2, Alpha Innotech Corporation) quantifiziert.

### 3.9 Immunhistochemie

In 4% Formaldehyd fixierte linksventrikuläre Myokardproben wurden in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost® Objektträger gezogen. Diese wurden bei Raumtemperatur getrocknet und für 12 Stunden in einem Brutschrank bei 60°C auf die Objektträger fixiert. Die Entfernung des Paraffins erfolgte in einem Xylolbad mit darauffolgendem Waschen in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70% Ethanol). Die Schnitte wurden 3x für 5 Minuten in Zitratpuffer (pH 6) bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht, um die Epitope für Antikörper zugänglich zu machen. Nach dem Abkühlen folgte das Blocken unspezifischer Epitope mit bovinem Serumalbumin (BSA) und die Inkubation mit den Primärantikörpern bei Raumtemperatur für 12 Stunden (ER alpha (Santa Cruz, MC-20), Troponin T (Neomarkers, AB 13-11), Vinculin (Sigma, hVin-1), Vimentin (Oncogene, Ab-1), Beta-Catenin (BD Biosciences), Caveolin-3 (Santa Cruz, A-3), Connexin 43 (Zymed, CX-1B1), Myosin-Schwerkette (Developmental studies, Hybridoma Bank). Nach weiterem Waschen und Blocken folgte die Inkubation mit den FITC-konjugierten anti-Kaninchen (Dianova) oder CY3-konjugierten anti-Maus (Dianova) Sekundärantikörpern für 2 Stunden. Eine Kernfärbung erfolgte mit DAPI (236276, Roche). Die Sichtbarmachung erfolgte an einem Konfokalmikroskop (Zeiss Confocal LSM 510). Unspezifische Bindungen der Primär-, Sekundärantikörper oder Autofluoreszenzen des Myokardgewebes wurden durch Auslassen der Primär- und/oder Sekundärantikörper und durch Benutzen eines Blocking Peptides ausgeschlossen.

### 3.10 Immunopräzipitation

LV-Myokardproben humaner Spenderherzen wurden in eisgekühlter Pufferlösung A (50 mM Tris pH 6.8, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM Sukrose, 0.25% (v/v) Triton X-100 und Complete Protease Inhibitor™ Mix (Roche)) in einem Dounce-Homogenisator bei 4°C homogenisiert. Die Homogenate wurden für 30 Minuten mit Benzonase (250 Einheiten) bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert und danach zentrifugiert. 1.1 ml des Überstandes wurde mit 50 µl Protein A-Sepharose für 30 Minuten bei 4°C geschüttelt. Die Protein A-Sepharose Kugeln wurden durch Zentrifugieren entfernt und 20 µl anti-ER alpha Antikörper wurden zu 0.5ml des Überstandes gegeben. Nach einer weiteren Inkubations- und Sedimentationsphase wurden die Proteine mithilfe eines 7.5% SDS-Gel getrennt und ein Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Beta-Catenin (siehe 3.8) durchgeführt.

### 3.11 Statistik

Alle Messwerte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Bei dem Vergleich von zwei Gruppen wurden entweder der Student's t-Test oder der Mann-Whitney U-Test verwendet. Bei dem Vergleich von mehreren Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ein- oder zweifaktorielle ANOVA) und gegebenenfalls eine Bonferroni-Korrektur oder ein Student Newman-Keuls post-Test durchgeführt. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson ermittelt. Die Immunfluoreszenz-Schnitte wurden von zwei unabhängigen Beobachtern bewertet. Für alle Tests wurde ein p-Wert von  $< 0.05$  als statistisch signifikant angenommen.

Alle statistischen Analysen wurden mit kommerziell erhältlicher Software (SPSS Version 11.0, GraphPad InStat3 Demoversion) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 ER-Expression in humanen LV-Myokardproben

#### 4.1.1 ER werden in humanen AS und DCM signifikant erhöht exprimiert

ER alpha mRNA war in LV-Myokardproben von Patienten mit AS 2.6 fach ( $p = 0.003$ , Abbildung 2A), ER alpha Protein 1.7 fach ( $p = 0.026$ , Abbildung 2B) erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen. ER beta mRNA lag in LV-Myokardproben von Patienten mit AS 2.6 fach ( $p < 0.005$ , Abbildung 2C) erhöht vor.

In LV-Myokardproben von Patienten mit DCM zeigte sich ein 1.8 facher Anstieg des ER alpha mRNA- und Proteingehalts ( $p = 0.0001$ , Abbildung 3A,B).

#### 4.1.2 Geschlechterunterschiede in der mRNA-Expression der ER in Patienten mit AS und DCM

ER beta mRNA-Gehalt war signifikant höher in LV-Myokardproben gesunder Männer als in denen gesunder Frauen ( $p < 0.005$ , Abbildung 2D). Der prozentuale Anstieg des ER beta mRNA-Gehalts in LV-Myokardproben von Frauen mit AS war jedoch signifikant höher als der Anstieg bei Männern mit AS ( $p = 0.005$ , Abbildung 2D).

Frauen mit DCM zeigten einen signifikant höheren prozentualen Anstieg des ER alpha Proteingehalts als Männer mit DCM ( $p = 0.013$ , Abbildung 3D).

#### 4.1.3 Korrelation zwischen ER und Hypertrophiemarkern

Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen ER beta und CnA beta ( $r = -0.83$ ,  $p = 0.002$ , Abbildung 2E), jedoch keine Korrelation zwischen ER beta und BNP (Abbildung 2F). ER alpha mRNA korrelierte weder mit CnA beta mRNA, noch mit BNP mRNA (Daten werden nicht gezeigt). Die Hypertrophiemarker CnA beta und BNP waren in LV-Myokardproben von Patienten mit AS 2.5 fach ( $p < 0.001$ ) und 10.1 fach ( $p < 0.05$ ) erhöht exprimiert im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Daten werden nicht gezeigt).

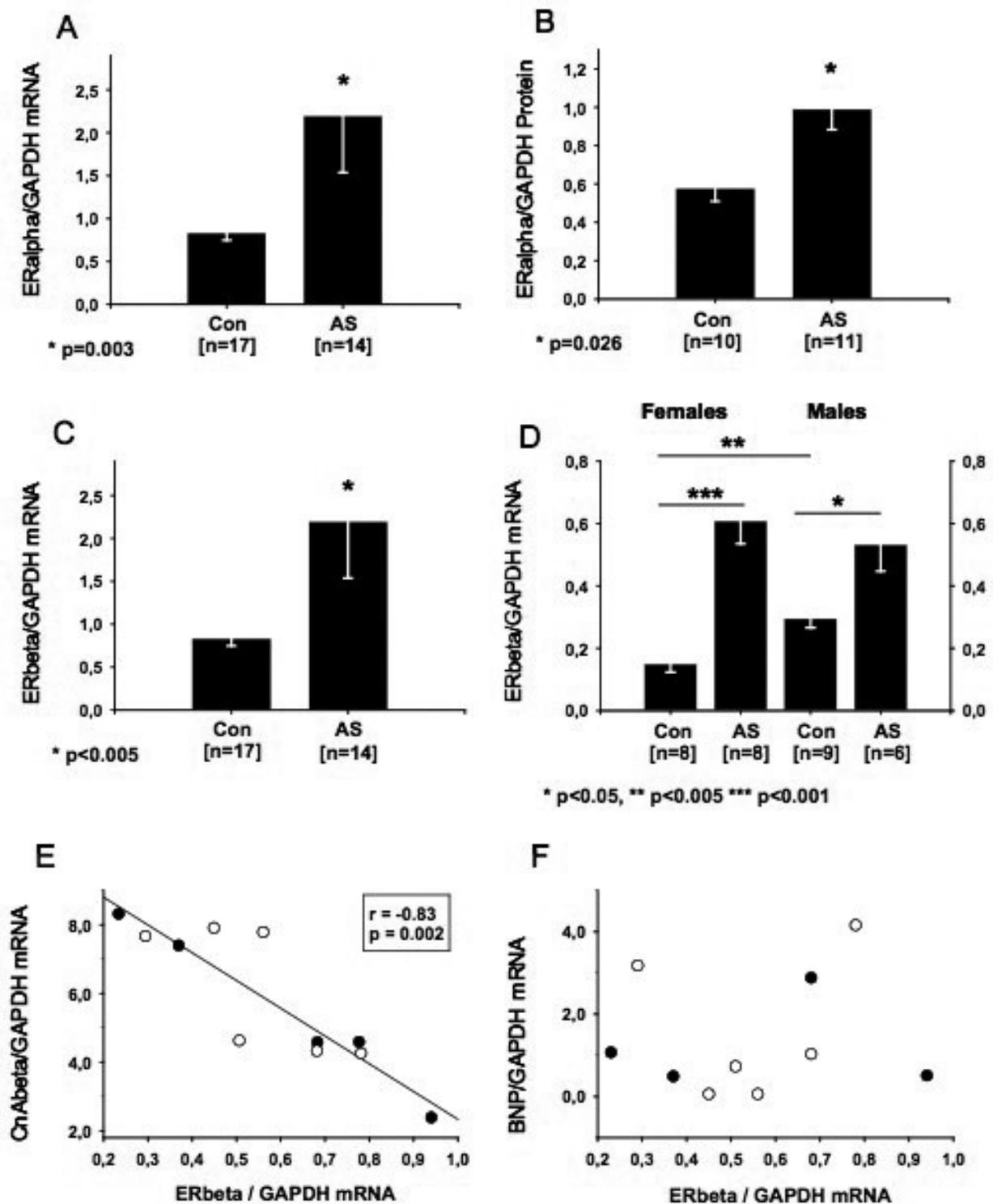


Abbildung 2: ER alpha und beta Expression in Patienten mit AS.

A) und B) ER alpha mRNA- und Proteingehalt waren signifikant erhöht in Patienten mit AS ( $p=0.003$ ,  $p=0.026$ ). C) ER beta mRNA-Gehalt war signifikant erhöht in Patienten mit AS ( $p<0.005$ ). D) ER beta mRNA-Gehalt war signifikant verschieden in weiblichen und männlichen Kontrollen ( $p<0.005$ ) und war erhöht in weiblichen und männlichen Patienten mit AS ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ). Der prozentuale Anstieg von ER beta mRNA war höher bei weiblichen als bei männlichen Patienten ( $p=0.005$ ). E) ER beta mRNA zeigte eine inverse Korrelation mit Cn A beta in Patienten mit AS ( $r=-0.83$ ,  $p=0.002$ ). F) ER beta mRNA zeigte keine Korrelation zur BNP-Expression in Patienten mit AS (( $\circ$ ) Frauen, ( $\bullet$ ) Männer). (\*, \*\*, \*\*\* = siehe oben) (nach ausgewählter Publikation 7. 1), Figure 1,3,4),

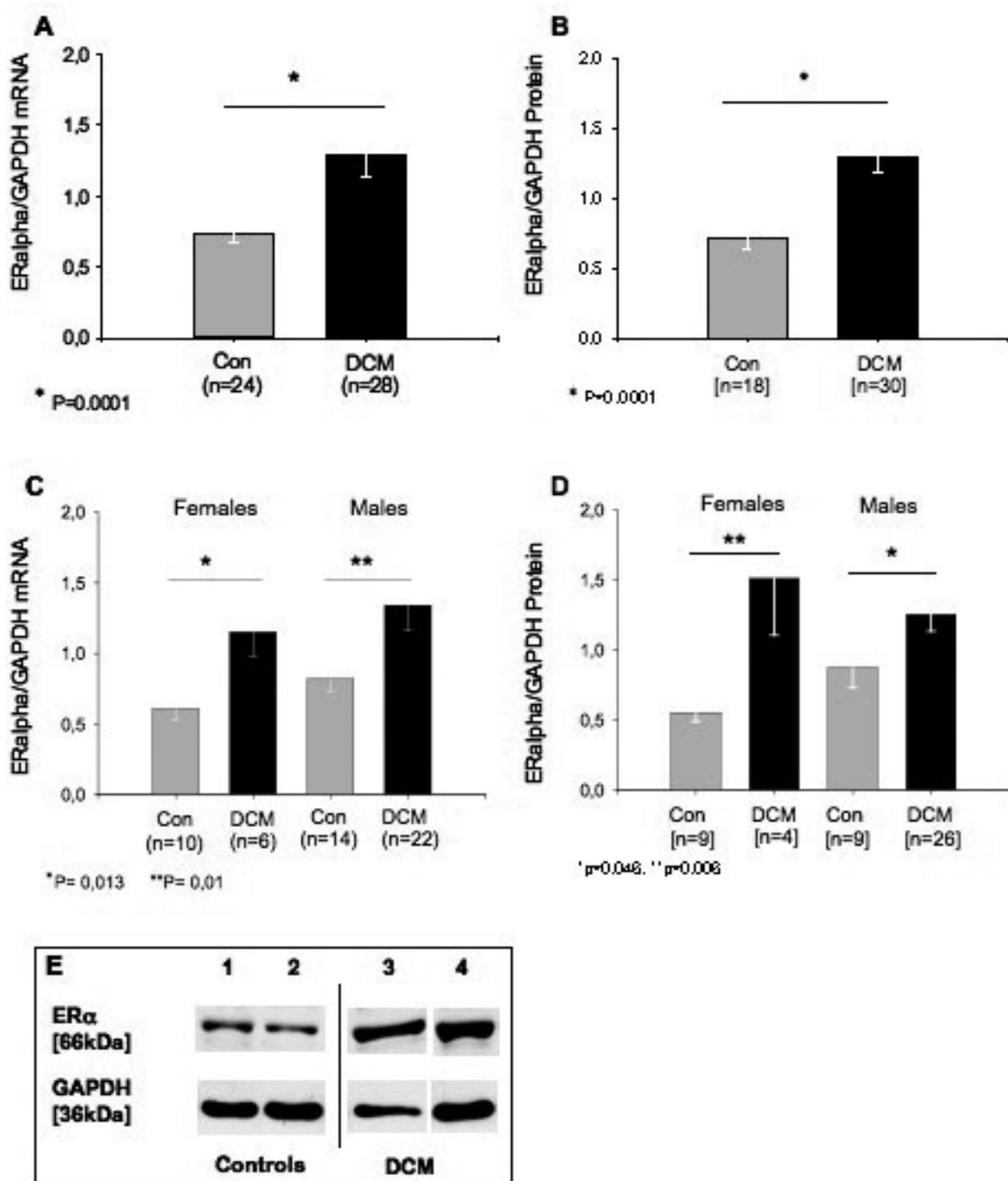


Abbildung 3: ER alpha Hochregulation in Patienten mit DCM.

A) und B) ER alpha mRNA- und Proteingehalt waren in Patienten mit DCM signifikant erhöht ( $p=0.0001$ ). C) und D) ER alpha mRNA- und Proteingehalt in gesunden Herzen und ihr Expressionsanstieg in Patienten mit DCM bei Männern ( $p=0.01$ ,  $p=0.006$ ) und Frauen ( $p=0.013$ ,  $p=0.046$ ). E) Exemplarischer Western Blot: 66kDa ER alpha Protein war in LV-Myokardproben von Patienten mit DCM hochreguliert (3:weiblich, 4: männlich) im Vergleich zu Kontrollen (1:weiblich, 2:männlich). (\*, \*\* = siehe oben) (aus ausgewählter Publikation 7. 2), Figure 1).

## 4.2 Lokalisation und Interaktion von ER in humanen LV-Myokardproben

### 4.2.1 Lokalisation von ER alpha im humanen Myokard

ER alpha waren im gesunden humanen Myokard in Kardiomyozyten membranassoziiert am Sarkolemm und an den Glanzstreifen lokalisiert. Außerdem wurden ER alpha Signale in Zellkernen von Myozyten und Nichtmyozyten, wie Fibroblasten, Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen in Gefäßwänden nachgewiesen (Abbildung 4).

Es zeigte sich ein gestreiftes Muster der ER alpha Verteilung in Kardiomyozyten. Um eine räumliche Assoziation von ER alpha zu myofibrillären, kontraktile Strukturen zu untersuchen, wurden die LV-Myokardproben mit Antikörpern gegen Troponin T und ER alpha, und Myosin-Schwermkette und ER alpha gefärbt. In beiden Fällen wurde ein sich abwechselndes gestreiftes Muster ohne Anhalt für eine Kolo-kalisation gefunden (Abbildung 4C,F). Es zeigte sich daher kein Anhalt für eine direkte räumliche Assoziation zwischen ER alpha und Troponin T oder Myosin-Schwermkette im gesunden Myokard von Männern und Frauen, sondern den Hinweis auf eine benachbarte Lokalisation.

Das myokardiale Sarkolemm umgibt die Myofibrillen und wurde anhand von Vinculin-färbungen sichtbar gemacht (Abbildung 4H). Vinculin ist ein myokardiales Strukturprotein, das am Sarkolemm an Transversaltubuli und Z-Scheiben vorkommt und an den Glanzstreifen lokalisiert ist. Die Doppelfärbung von ER alpha und Vinculin ergab eine Kolo-kalisation an Sarkolemm und Glanzstreifen und somit den Hinweis auf eine identische Lokalisation von ER alpha und Vinculin im gesunden Myokard (Abbildung 4I). ER alpha waren somit am myokardialen Sarkolemm und an den Glanzstreifen lokalisiert.

Eine Lokalisation von ER alpha in Caveolae von Plasmamembranen kardialer Myozyten wird diskutiert. Eine Doppelfärbung von ER alpha mit dem Caveolae Marker Caveolin-3 zeigte jedoch keinen Anhalt für eine Kolo-kalisation (Abbildung 4L).

Um herauszufinden, ob ER alpha mit weiteren Proteinen an Glanzstreifen kolo-kalisierte, wurden die LV-Myokardproben mit Antikörpern gegen ER alpha und dem „*gap junction*“ Protein Connexin 43 gefärbt. ER alpha und Connexin 43 waren in gesunden Herzen an Glanzstreifen der Kardiomyozyten lokalisiert, zeigten aber keine Kolo-kalisation (Fig 4N, O).

Fibroblasten und Endothelzellen konnten anhand von Vimentinfärbungen sichtbar gemacht werden. Eine Kofärbung von ER alpha und Vimentin zeigte ER alpha positive Signale in Zellkernen Vimentin positiver Zellen im Myokard (Fibroblasten) (Abbildung 4R), und in Zellkernen Vimentin positiver Zellen im Lumen von Gefäßen (Endothelzellen). In größeren Gefäßen zeigten sich

ER alpha Signale ebenfalls in Zellkernen der Gefäßwand, die am ehesten glatten Gefäßmuskelzellen entsprachen (siehe ausgewählte Publikation 7. 2), Figure 2K).

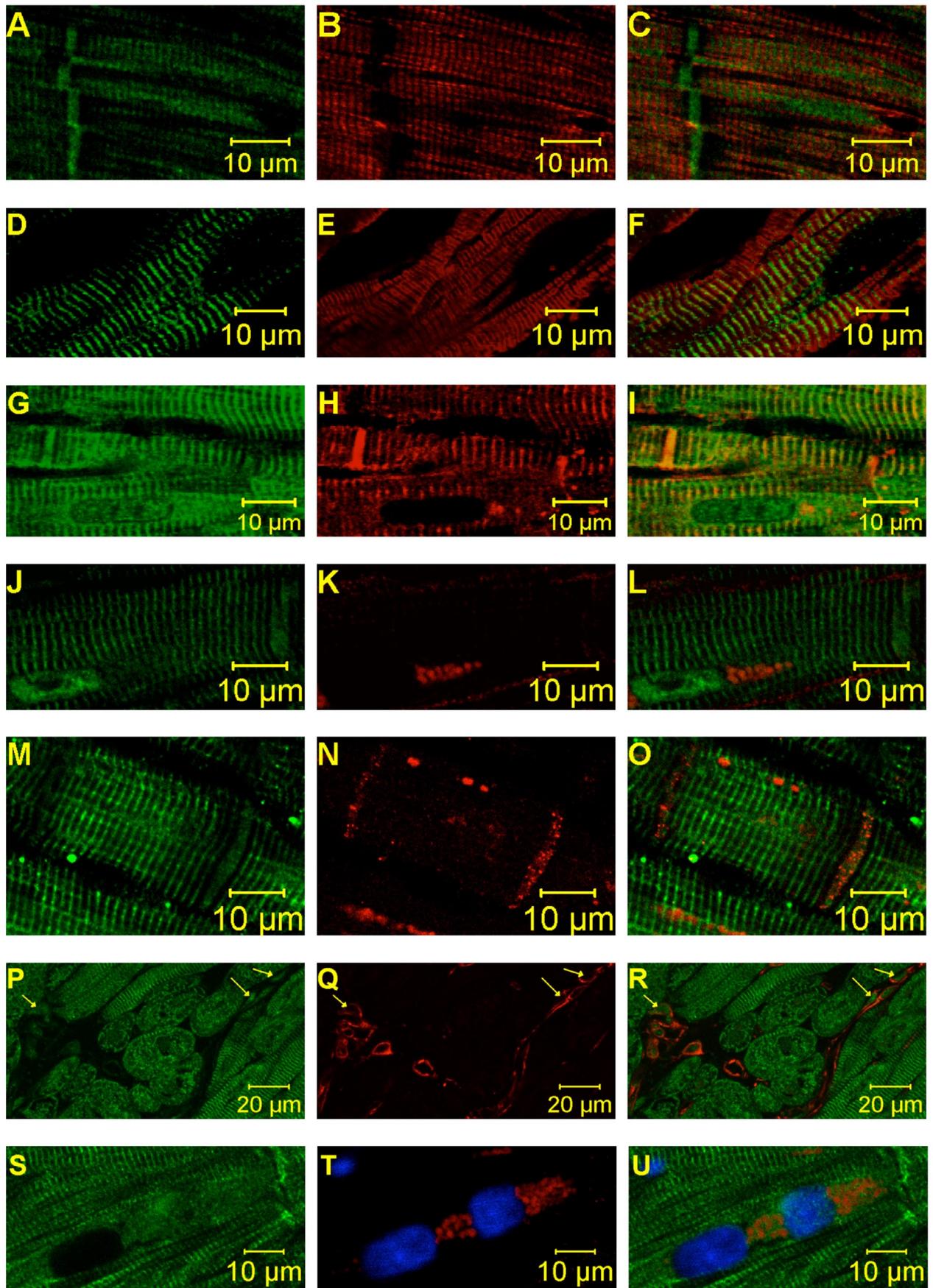
Zellkerne wurden anhand von DAPI-Färbungen sichtbar gemacht und ER alpha Signale in vielen, aber nicht allen Zellkernen von Myozyten im gesunden und dilatiertem Myokard gezeigt (Abbildung 4T, U).

Anhand von Negativkontrollen wurde die Spezifität des ER alpha Signals nachgewiesen. Um unspezifische Bindungen der Sekundäntikörper auszuschließen, wurden die Primäntikörper weggelassen (Abbildung 5C). Um unspezifische Signale des Myokards sichtbar zu machen, sogenannte Autofluoreszenzen, wurden Primär- und Sekundäntikörper ausgespart (Abbildung 5D).

Unspezifische Bindungen des ER alpha Primäntikörpers wurden durch die Verwendung eines spezifischen Blocking Peptides für ER alpha ausgeschlossen (Abbildung 5A, B). Unspezifische Bindungen der Antikörper lagen nicht vor. Antikörperunabhängige Signale, Autofluoreszenzen des Myokards, fanden wir perinukleär in Kardiomyozyten (Lipofuszin) (Abbildung 5D).

Abbildung 4:

LV-Myokard Schnitte gesunder Herzen. Jede horizontale Reihe stellt jeweils einen Myokardschnitt dar, der für ER alpha und ein weiteres Protein angefärbt wurde. Die erste Spalte zeigt jeweils ER alpha (grün) (A,D,G,J,M,P,S), die zweite das jeweils andere Strukturprotein (Troponin T (rot,B), Myosin-Schwerkette (rot,E), Vinculin (rot,H), Kolokalisation ER alpha und Vinculin (gelb,I), Caveolin-3 (rot,K), Connexin 43 (rot,N), Vimentin, (rot,Q), DAPI (blau, rot=Lipofuszin,T)) und die dritte Spalte zeigt ein Fusionsbild der beiden ersten Bilder (nach ausgewählter Publikation 7. 2), Figure 2).



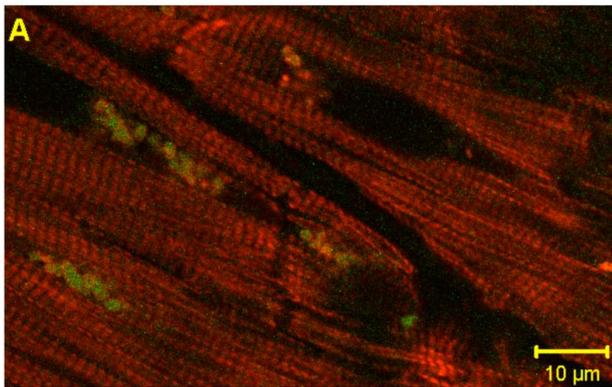
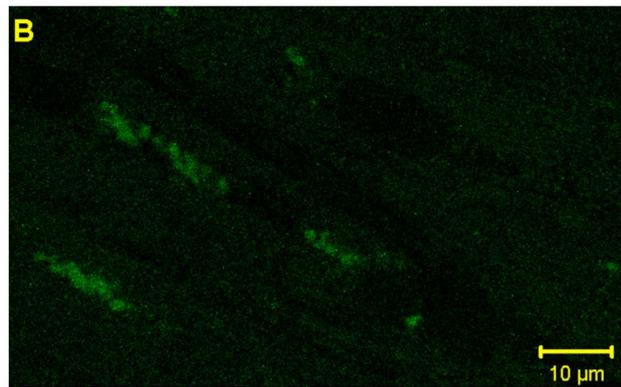
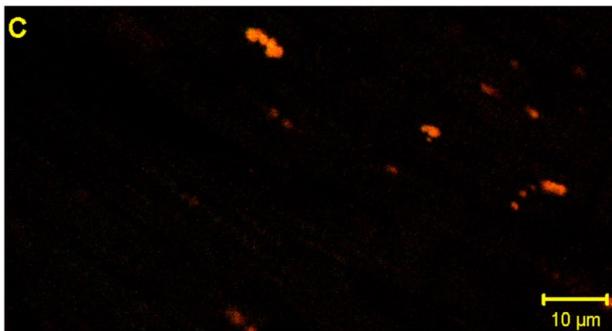
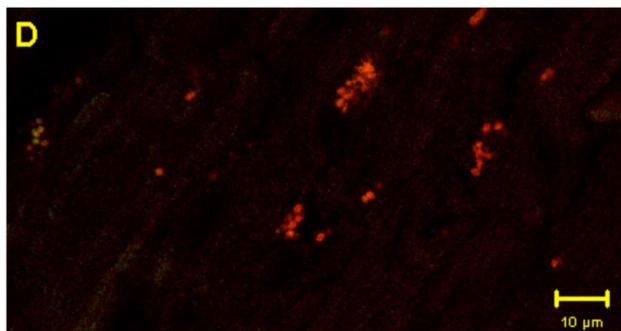
**Blocking Peptid + Troponin T (rot)****Blocking Peptid****Negativkontrolle****Autofluoreszenz**

Abbildung 5: Negativkontrollen: A und B zeigen ER alpha und Blocking Peptid; zur Darstellung des Myokards erfolgte die Anfärbung für Troponin T (rot,A); C zeigt kein Signal nach Weglassen des Sekundärantikörpers und D zeigt das Ergebnis nach Weglassen der Primär- und Sekundärantikörper. Punktförmige perinukleäre Strukturen entsprachen am ehesten Lipofuszin (rot/grün in A, grün in B, rot in C und D). Es zeigten sich keine falsch positiven Signale, die ER alpha Signalen ähnelten.

#### 4.2.2 Lokalisationsänderung von ER alpha in DCM und AS

In 12 (86%) von 14 Myokardproben gesunder Kontrollen konnte ein ER alpha Signal an den Glanzstreifen nachgewiesen werden (Abbildung 6A). Im Myokard von Patienten mit DCM zeigte sich eine signifikante Reduktion des ER alpha Signals an den Glanzstreifen in 4 (30%) von 13 Myokardproben ( $p < 0.001$ ) bei vergleichbarem ER alpha Signal an Zellmembranen der Kardiomyozyten (Abbildung 6B, 7D, F) und in Zellkernen von Myozyten und Nichtmyozyten (Daten nicht gezeigt). In einer Probe eines Patienten mit AS konnte ebenfalls kein ER alpha Signal an den Glanzstreifen der Myozyten detektiert werden (Abbildung 7G, I).

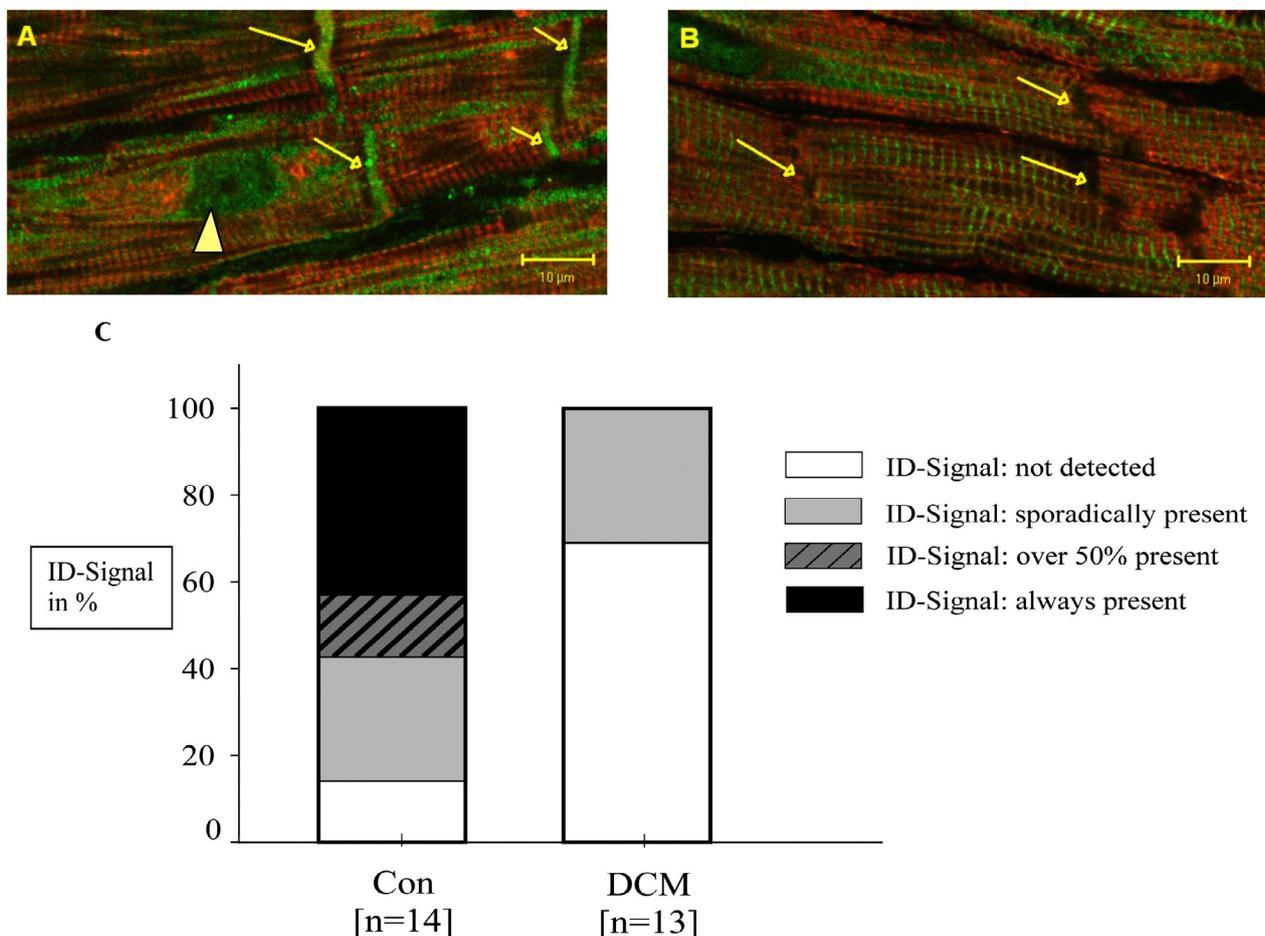


Abbildung 6: ER alpha Lokalisationsänderung in LV-Myokardproben von Patienten mit DCM. A) Ausschnitt einer LV-Myokardprobe eines männlichen gesunden Herzens und B) eines männlichen Patienten mit DCM. ER alpha (grün), Troponin T (rot). Pfeile zeigen die Areale der Glanzstreifen, das Dreieck zeigt einen ER alpha enthaltenden Kern. C) In Patienten mit DCM war das ER alpha Signal an den Glanzstreifen signifikant reduziert ( $P < 0.001$ ). ID=Intercalated disc (engl. für Glanzstreifen), n = Probenanzahl. ID-Signal= positives Signal für ER alpha an Glanzstreifen der Kardiomyozyten. ID-Signal: not detected = keine Glanzstreifen mit positivem ER alpha Signal in untersuchter LV-Myokardprobe, ID-Signal: sporadically present = ER alpha Signal in weniger als 50% der Glanzstreifen der untersuchten LV-Myokardprobe vorhanden, ID-Signal: over 50% present = ER alpha Signal in mehr als 50% der Glanzstreifen der untersuchten LV-Myokardprobe vorhanden, ID-Signal: always present = ER alpha Signal in allen Glanzstreifen der untersuchten LV-Myokardprobe vorhanden (aus ausgewählter Publikation 7. 2), Figure 3).

### 4.2.3 Kolokalisation von ER alpha mit Beta-Catenin

Ein ER alpha Signal an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten konnte in 86% der gesunden humanen Myokardproben gezeigt werden. ER alpha kolokalisierte mit Vinculin an den Glanzstreifen und zeigte keine Kolokalisation mit Connexin 43 oder Caveolin-3, die ebenfalls an Glanzstreifen lokalisiert waren.

Glanzstreifen von Kardiomyozyten bestehen zu einem Teil aus Adhäsionskomplexen, die das Protein Beta-Catenin enthalten. Um eine eventuelle Kolokalisation zu untersuchen, wurden LV-Myokardproben mit Antikörpern gegen ER alpha und Beta-Catenin angefärbt. In 14 (100%) Myokardproben gesunder Patienten zeigte sich ein deutliches Signal für Beta-Catenin an den Glanzstreifen (Abbildung 7B); in den untersuchten Myokardproben, die ER alpha Signale an Glanzstreifen aufwiesen (in 12 (86%) von 14 Myokardproben), zeigte sich eine Kolokalisation für ER alpha und Beta-Catenin (Abbildung 7C).

In Myokardproben, in denen kein Signal für ER alpha an Glanzstreifen nachweisbar war (9 (70% von 13 DCM-Myokardproben), konnte keine Kolokalisation für ER alpha und Beta-Catenin gezeigt werden (Abbildung 7F, I). Die Lokalisation und Lokalisationsänderung von ER alpha wies keinerlei Geschlechterunterschiede auf.

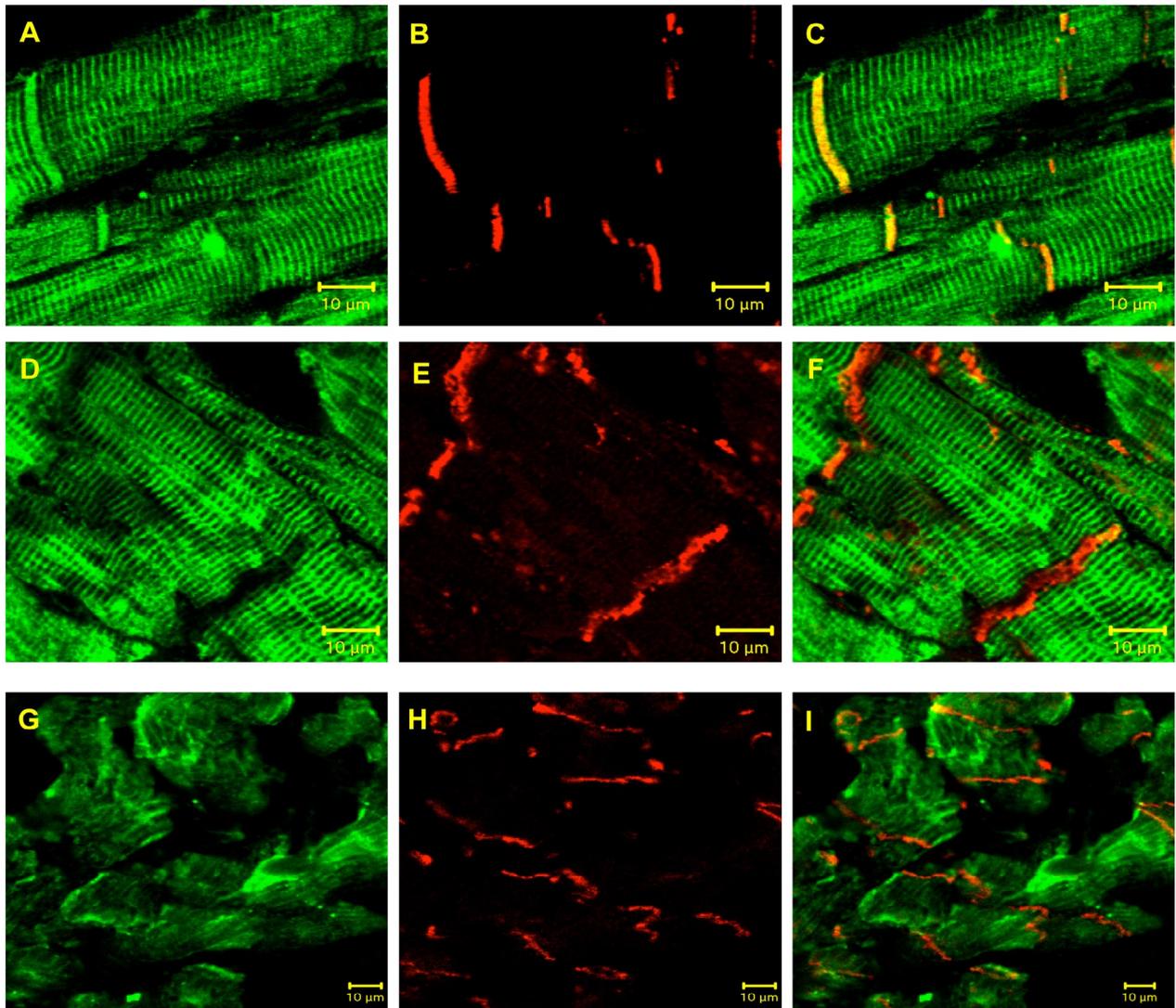


Abbildung 7: ER alpha (grün, A,C,D,F,G,I) und Beta-Catenin (rot, B,C,E,F,H,I) zeigten im gesunden humanen Myokard (A-C) eine Kolokalisation (gelb,C) an Glanzstreifen. Im Myokard von Patienten mit DCM (D-F) und AS (G-I) ist kein ER alpha Signal an Glanzstreifen (D,F,G,I) zu erkennen, somit auch keine Kolokalisation mit Beta-Catenin (F,I). Jede horizontale Reihe zeigt jeweils einen Myokardschnitt, der für ER alpha (grün) und Beta-Catenin (rot) gefärbt wurde. Das dritte Bild jeder Reihe zeigt jeweils ein Fusionsbild der ersten beiden (aus ausgewählter Publikation 7. 2), Figure 4).

#### 4.2.4 ER alpha und Beta-Catenin interagieren im gesunden humanem Myokard

Nachdem die Kolokalisation von ER alpha und Beta-Catenin an Glanzstreifen im gesunden humanen Myokard gezeigt werden konnte, wurde im Anschluß eine Interaktion zwischen beiden Proteinen durch einen Koimmunopräzipitationsassay nachgewiesen (Abbildung 8). Diese Interaktion spricht für einen potentiell funktionellen Proteinkomplex aus ER alpha und Beta-Catenin in gesunden humanen Herzen.

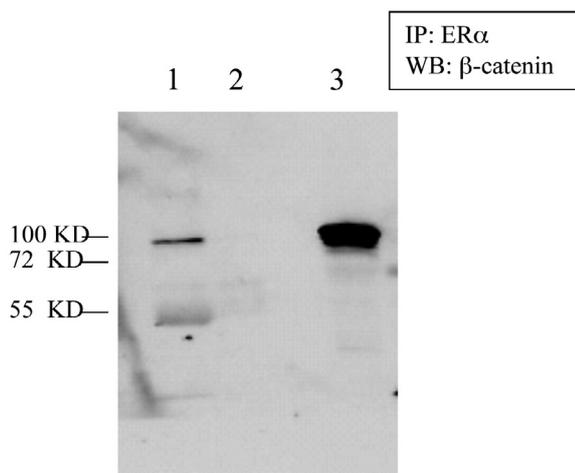


Abbildung 8: Immunpräzipitationsanalyse der Interaktion von ER alpha und Beta-Catenin im gesunden humanen Myokard.

Lysate myokardialer Proben von gesunden Kontrollen wurden mit Antikörpern gegen ER alpha inkubiert (Spur 1), woraufhin Proteinkomplexe mit Protein A-Sepharose Kugeln präzipitierten. Protein A-Sepharose Kugeln und Lysate alleine wurden als Negativkontrollen genutzt (Spur 2). Lysate, die weder Antikörper, noch Protein A-Sepharose beinhalten, wurden als Positivkontrolle genutzt (Spur 3). Der Antikörper gegen Beta-Catenin zeigt auf der zu erwartenden Höhe von 92kDa eine Bande für Beta-Catenin (Spur 1 und 3) (aus ausgewählter Publikation 7. 2), Figure 6).

## 4.3 Funktion von E2 in vivo und in vitro

### 4.3.1 E2 verbessert Hämodynamik und reduziert druckinduzierte LV-Hypertrophie im Tiermodell

Die TAC-Operation führte in der Placebo-Gruppe zu einem Anstieg der LV-Masse, des LV enddiastolischen und endsystolischen Durchmessers (LVEDD und LVESD;  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ) sowie zur Reduktion der Verkürzungsfraction (FS,  $p < 0.05$ ). Die Substitution von E2 führte zu einer Verringerung der LV-Dilatation und Verbesserung der LV-Funktion ( $p < 0.05$ ), sowie zu einem abgeschwächten Anstieg der LV-Masse (Abbildung 9A).

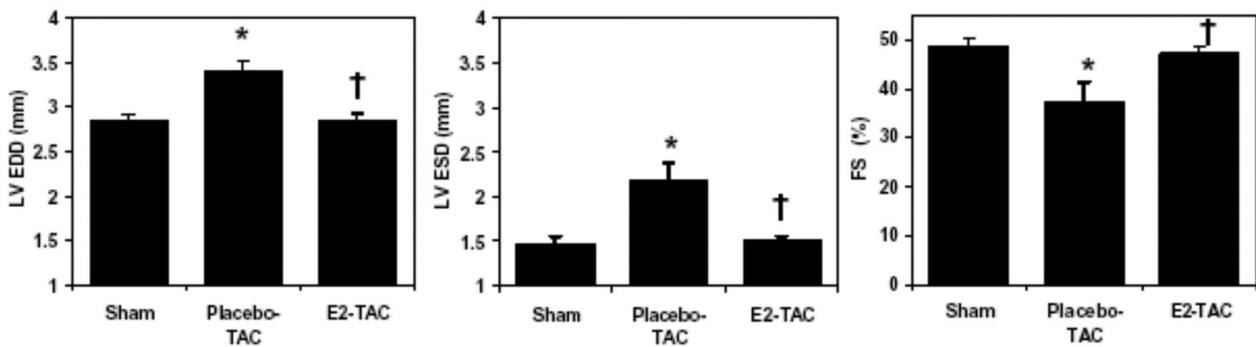
In der Placebo-TAC Gruppe zeigte sich eine Verschlechterung der kardialen Funktion in Form von signifikant erhöhtem linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP,  $p < 0.05$ ) und einem verringerten LV  $dp/dt$  ( $p < 0.05$ ), die durch E2-Substitution verbessert wurden (LVEDP,  $p < 0.05$ ; LV  $dp/dt$ ,  $p = ns$ ; siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Table).

Die Analysen der Druck-Volumen Kurven zeigten darüberhinaus, dass die TAC-Operation zu einer Verminderung des Schlagvolumens ( $p < 0.05$ ) und des Herzzeitvolumens ( $p < 0.05$ ) führte, die durch E2-Substitution signifikant verbessert wurde ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). Außerdem trat nach TAC-Operation eine signifikante LV-Dilatation ( $p < 0.05$ ) und Reduktion der LVEF ( $p < 0.05$ ) auf. Die E2-Substitution verhinderte diese LV-Dilatation ( $p < 0.05$ ) und führte zu einer partiellen Wiederherstellung der LVEF ( $p < 0.05$ , Abbildung 9 B).

TAC reduzierte zwei hämodynamische Messwerte für Kontraktilität: das endsystolische Druck-/Volumenverhältnis (ESPVR=“*endsystolic pressure volume relationship*“) und die vorlastabhängige Schlagarbeit (PRSW=“*preload recruitable stroke work*“;  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). Beide Werte wurden durch E2-Substitution normalisiert. ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ , Abbildung 9 B).

Ein vergleichbares Ausmaß der Aortenkonstriktion in der Placebo- und der E2-Gruppe konnte anhand von echokardiographisch ähnlich gemessener mittlerer Geschwindigkeiten im Pulswellendoppler gezeigt werden (Placebo-TAC =  $3.91 \pm 0.12$  m/s versus E2-TAC =  $3.84 \pm 0.29$  m/s). In beiden Fällen zeigte sich die Aortenkonstriktion signifikant höher als bei Sham operierten Mäusen ( $1.080 \pm 0.10$  m/s;  $p < 0.001$  vs. TAC Gruppe; Daten werden nicht gezeigt).

A



B

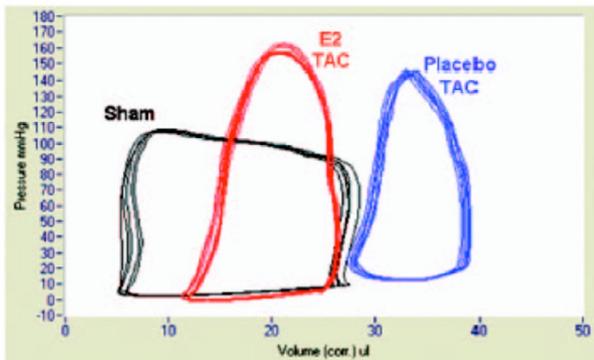


Abbildung 9: A) LVEDD und LVESD wurden durch TAC signifikant erhöht ( $P < 0.05$ ) und durch E2-Substitution wurde diese Entwicklung während druckinduzierter Hypertrophie verhindert. FS wurde durch TAC signifikant reduziert ( $P < 0.05$ ) und durch E2-Substitution wurde dies verhindert. \*= $p < 0.05$  Placebo-TAC vs. Sham, †= $p < 0.05$  E2-TAC vs. Placebo-TAC.

B) Druck-Volumen-Analyse: Beispielhafte Kurven von Sham, E2-TAC und Placebo-TAC. Die Kurve der Placebo-TAC verschob sich nach rechts, im Sinne einer LV-Dilatation, die durch E2-Substitution (E2-TAC) aufgehalten wurde (aus ausgewählter Publikation 7. 3), Figure1).

#### 4.3.2 E2 reduziert Hypertrophie kardialer Myozyten

In placebobehandelten Mäusen erhöhte die TAC-Operation die Fläche, Länge und Breite der Myozyten im Vergleich zu Sham ( $p < 0.05$ ). E2-Substitution verringerte signifikant die Fläche und Länge der Myozyten ( $p < 0.05$ ), wirkte sich aber nicht signifikant auf das Breitenwachstum aus ( $p = ns$ ; Abbildung 10).

Zusammenfassend verringert E2-Substitution druckinduzierte LV- und Myozytenhypertrophie durch Verhinderung der Myozytenelongation, LV-Dilatation und LV-Dysfunktion und begünstigt eine eher konzentrische Form der Hypertrophie.

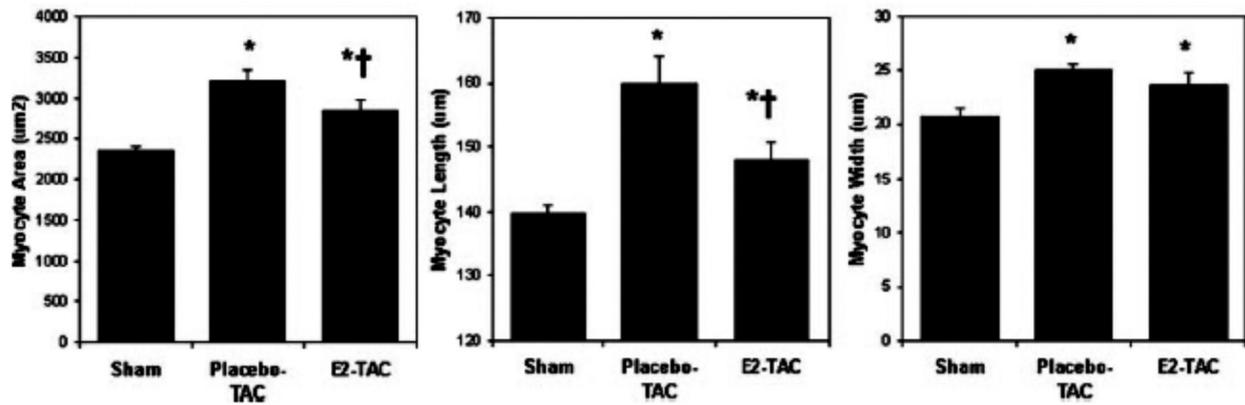


Abbildung 10: TAC erhöhte signifikant die Fläche (myocyte area), die Länge (myocyte length) und die Breite (myocyte width) der Kardiomyozyten. E2-Substitution verhinderte die druckinduzierte Vergrößerung der Fläche und Länge, nicht jedoch der Breite. \*= $p < 0.05$  Placebo-TAC und E2-TAC vs. Sham, †= $p < 0.05$  E2-TAC vs. Placebo-TAC (aus ausgewählter Publikation 7. 3), Figure 1).

#### 4.3.3 E2 beeinflusst die Expression hypertropher Gene und Calcineurinsignalwege in vivo

Die TAC-Operation führte zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression von ANP und beta-Myosin-Schwerkette (beta-MHC) ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ) in placebobehandelten Mäusen, wohingegen die Genexpression von ANP und beta-MHC in östrogensubstituierten Mäusen signifikant verringert war ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ; Daten werden nicht gezeigt).

Es zeigten sich keine Expressionsunterschiede von CnA beta mRNA durch alleinige TAC-Operation oder zusätzliche E2-Substitution. CnA beta Proteingehalt hingegen war in Placebo-TAC Mäusen signifikant erhöht ( $p < 0.05$ ) und durch E2-Substitution verringert ( $p < 0.05$ ; Abbildung 11). Die gleichen Ergebnisse wurden für eine Splicevariante des „*modulatory calcineurin interacting protein 1*“ (MCIP 1) gezeigt, der MCIP 1.4 mRNA. MCIP 1.4 ist an der Calcineurin-NFAT-Aktivierung beteiligt (siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 2A).

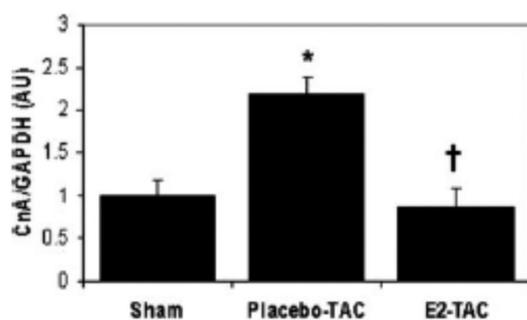


Abbildung 11: CnA Protein wurde in Placebo-TAC signifikant erhöht; dies wurde durch E2-Substitution verhindert. \*= $p < 0.05$  Placebo-TAC vs. Sham, †= $p < 0.05$  E2-TAC vs. Placebo-TAC (aus ausgewählter Publikation 7. 3), Figure 2).

#### **4.3.4 E2-Substitution verringert Calcineurin-NFAT-Aktivierung**

Um die Auswirkung der E2-Substitution auf die Calcineurin-NFAT-Aktivierung *in vivo* zu untersuchen, wurden transgene Mäuse (n = 18), die ubiquitär NFAT-aktivierte Promotor-Luziferase Reporterkonstrukte exprimierten, genutzt, die dem gleichen Versuchsprotokoll unterzogen wurden, wie in Abbildung 1 dargestellt wurde. Eine erhöhte Luziferaseaktivität war dabei Ausdruck einer erhöhten Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges.

Luziferase Reporterassays an myokardialen Zelllysaten zeigten eine signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität in Placebo-TAC Mäusen verglichen mit Sham Mäusen ( $p < 0.05$ ); E2-Substitution verminderte signifikant den Anstieg der Luziferaseaktivität ( $p < 0.05$ ) und somit den zur Hypertrophie führenden Signalweg über die Calcineurin-NFAT-Aktivierung (siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 2B).

#### **4.3.5 E2 zeigt keinen antihypertrophen Effekt in Calcineurin A beta Knockout Mäusen**

Als nächstes wurde der Effekt der E2-Substitution bei TAC-induzierter Hypertrophie in weiblichen homozygoten CnA beta Knockout-Mäusen (n = 20) und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern als Kontrollen (n = 27) untersucht.

E2-Substitution verhinderte LV-Hypertrophie in Wildtyp-TAC Mäusen ( $p < 0.05$ ), nicht jedoch in CnA beta Knockout-Mäusen, die einer TAC-Operation unterzogen wurden (siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 2C). Dies spricht dafür, dass E2 seine antihypertrophe Wirkung über die Beeinflussung von Calcineurin ausübt.

#### **4.3.6 E2 beeinflusst Kardiomyozytenhypertrophie und Calcineurinsignaling über ER *in vitro***

Ventrikuläre Myozyten neonataler Ratten (NRVM) wurden mit einem alpha1-adrenergischem Rezeptoragonist, Phenylephrine (PE), stimuliert, um einen Hypertrophiestimulus zu setzen.

E2-Substitution verhinderte PE-induzierte Vergrößerung der Kardiomyozytenzellfläche ( $p < 0.05$ ; Abbildung 12) und verringerte signifikant die PE-induzierte Erhöhung der ANP Expression ( $p < 0.05$ ; siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 3B). Diese E2-Effekte wurden durch Präinkubation mit dem ER-Antagonisten ICI 182,780 verhindert (ICI) ( $p < 0.05$ ; Abbildung 12), was für einen ER-vermittelten Effekt von E2 spricht.

E2 verhinderte ebenfalls den PE-induzierten Anstieg von CnA beta Proteingehalt und ICI machte dies wiederum rückgängig ( $p < 0.05$ ; siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 4A). E2 hatte dabei keinen Effekt auf CnA beta mRNA 6-24h nach PE Stimulation (siehe ausgewählte Publikation 7. 3), supplemental Figure IV,B).

E2 verhinderte außerdem signifikant die PE-induzierte NFAT-Aktivierung in NRVM ( $p < 0.05$ ; siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 4A).

Um herauszufinden, ob die antihypertrophe Wirkung von E2 der Beeinflussung der Calcineurinsignalwege bedarf, wurden NRVM entweder mit einer Calcineurinmutations- (constitutively active (ca) mutant of CnA) oder einem GFP-Konstrukt als Kontrolle transfiziert.

E2 übte keinen Effekt auf Myozytenwachstum oder NFAT-Aktivierung der NRVM aus, die mit der caCnA Mutante infiziert waren, verringerte jedoch die PE-induzierte Zellvergrößerung und NFAT-Aktivierung in GFP exprimierenden NRVM ( $p < 0.05$ ; siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 4B).

Als nächstes wurden NRVM vor der Stimulation mit PE entweder mit E2, dem Calcineurininhibitor Cyclosporin oder einer Kombination der beiden vorbehandelt. Die Kombination von E2 und dem Calcineurininhibitor Cyclosporin führte dazu, dass E2 das PE-induzierte Myozytenwachstum nicht mehr verhinderte (siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 4C).

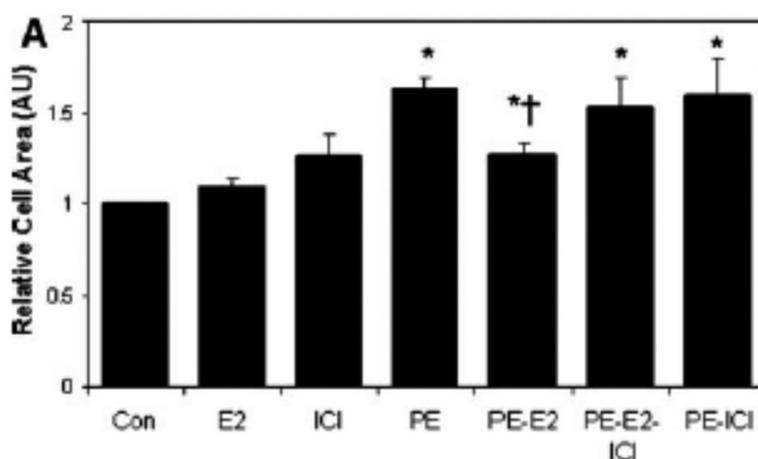


Abbildung 12: Relative Cell Area = relative Fläche der Zellen (der ventrikulären Myozyten neonataler Ratten). E2 oder ICI alleine veränderten die relative Zellfläche nicht. Stimulation mit PE führte zu einem signifikanten Anstieg der relativen Zellfläche im Vergleich zu Kontrollen (Con) (\*= $p < 0.05$  immer vs. Con). Die Präinkubation der Zellen mit E2 vor einer Stimulation mit PE führte zu einer signifikanten Reduktion des Anstiegs der relativen Zellfläche im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PE (†= $p < 0.05$  PE-E2 vs. PE) (aus ausgewählter Publikation 7. 3), Figure 3).

#### 4.3.7 E2 beeinflusst die Degradation von Calcineurin

Da E2-Substitution zu einer Verringerung des Proteingehaltsanstiegs, nicht jedoch des mRNA-Gehalts von Calcineurin führte, wurde untersucht, ob E2 diesen Effekt über die Beeinflussung der Degradation von Calcineurin ausübt.

NRVM wurden vor der Stimulation mit PE mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximide vorbehandelt, um mögliche Beeinflussung durch Proteinneusynthese auszuschließen.

Die Halbwertszeit von Calcineurin in Kontrollzellen betrug 15.1 Stunden (Daten werden nicht gezeigt). Diese wurde durch PE-Stimulation signifikant verlängert ( $p < 0.05$ ), was zu der Annahme führte, dass der Anstieg von Calcineurin durch eine reduzierte Degradation von Calcineurin bewirkt wurde. E2 verhinderte die PE-induzierte Stabilisierung von Calcineurin in Anwesenheit von Cycloheximide ( $p < 0.05$ ). Dies wurde durch den ER-Antagonisten ICI verhindert ( $p < 0.05$ ; Daten werden nicht gezeigt).

Die Calcineurindegradation bedarf 26S Proteasomen (42). Um eine mögliche Beeinflussung der Calcineurindegradation durch E2 zu prüfen, wurden die Kardiomyozyten mit einem Proteasominhibitor, Lactacystin, 1 Stunde vor PE-Stimulation behandelt.

Lactacystin verhinderte die Degradation von Calcineurin und führte somit zu einem Anstieg des Proteingehalts von CnA ( $p < 0.01$ ; siehe ausgewählte Publikation 7.3), Figure 5B). Eine PE-induzierte Erhöhung des CnA Proteins war nicht mehr möglich, da die Degradation durch Lactacystin bereits verhindert wurde. E2-Substitution führte unter diesen Bedingungen nicht zu einer Verringerung des Proteingehaltes von CnA (siehe ausgewählte Publikation 7.3), Figure 5A). Die Präinkubation mit Lactacystin verhinderte ebenfalls die antihypertrophe Wirkung der E2-Substitution auf PE-induzierte Hypertrophie (Zellgröße) der NRVM (siehe ausgewählte Publikation 7.3), Figure 5B). Dies führt zu der Annahme, daß intakte 26S Proteasome für die Regulation der CnA Expression durch PE und E2 notwendig sind.

Bei der Proteindegredation spielt die Ubiquitinilierung, das Hinzufügen von Polyubiquitinketten an Lysinreste spezifisch markierter Proteine, eine wichtige Rolle.

Daher wurde das Ausmaß und eine mögliche Beeinflussung der Ubiquitinilierung von CnA durch Vorbehandlung mit E2 während PE-stimulierter Hypertrophie untersucht.

NRVM wurden dafür mit einem Plasmid transfiziert, welches mit einem myc-tagged ubiquitin Konstrukt kodiert war. Die Zellen wurden vier Stunden nach PE-Stimulation geerntet und Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen myc-Epitope oder Calcineurin durchgeführt.

Calcineurin-Ubiquitinierung wurde durch PE-Stimulation verringert ( $p < 0.05$ ), und E2-Vorbehandlung stellte die Calcineurin-Ubiquitinierung wieder her ( $p < 0.05$ ; Abbildung 13).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß E2 die Degradation von CnA durch einen ER-abhängigen Mechanismus verstärkt, wobei die Ubiquitinierung von CnA eine Rolle spielt.

Die Degradation von CnA ist abhängig von der spezifischen E3 Ubiquitin Ligase Atrogin1, welche mit CnA assoziiert ist und die CnA Ubiquitinierung katalysiert.

Daher wurde die mRNA Expression von Atrogin1 und von zwei weiteren E3 Ubiquitin Ligasen, „*Mouse Double Minute 2*“ (MDM2) und Muskel spezifisches Ringfingerprotein 1 (MuRF1) in TAC- und Wildtyp-Mäusen quantifiziert. TAC führte zu einer signifikanten Verringerung der Expression von Atrogin1, MDM2 und MuRF1 in placebobehandelten Mäusen ( $p < 0.05$ ) (siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 6). E2-Substitution hatte keinen Effekt auf TAC-induzierte Verringerung der Atrogin1 Expression, normalisierte jedoch die Expression von MDM2 ( $p < 0.05$ ) und MuRF1 ( $p < 0.05$ ) Levels vergleichbar zu den in Sham-operierten Mäusen (siehe ausgewählte Publikation 7. 3), Figure 6).

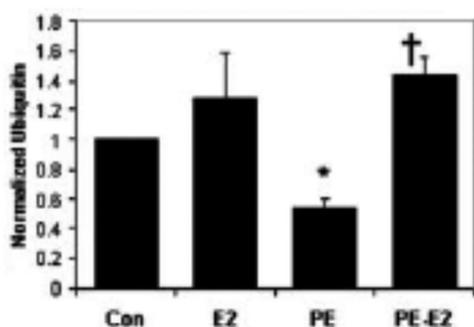


Abbildung 13:

Die Stimulation der ventrikulären Myozyten neonataler Ratten mit PE führte zu einer signifikanten Reduktion der Calcineurin-Ubiquitinierung ( $*=p < 0.05$  PE vs. Con). E2-Substitution vor PE-Stimulation führte zu einer signifikanten Verhinderung der Reduktion der Calcineurin-Ubiquitinierung ( $†=p < 0.05$  PE-E2 vs. PE) (aus ausgewählter Publikation 7. 3), Figure 5).

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ER in hypertrophierten und dilatierten humanen Herzen signifikant erhöht exprimiert vorlagen. Frauen zeigten dabei einen höheren Expressionsanstieg als Männer. Eine Lokalisation von ER alpha konnte an Zellmembranen und Glanzstreifen von Kardiomyozyten und in Zellkernen von Myozyten und Nichtmyozyten gezeigt werden. ER alpha kolokalisierte und interagiert mit dem Protein Beta-Catenin an Glanzstreifen gesunder Herzen und war signifikant reduziert an den Glanzstreifen myokardialer Proben von Patienten mit DCM und AS. Im Tiermodell wirkte E2 der druckinduzierten LV-Hypertrophie entgegen und führte zu einer Verminderung der Kardiomyozytenhypertrophie und zu einer Verbesserung der LV-Funktion. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass E2 seinen antihypertrophen Effekt ER abhängig über die Erhöhung der Degradation von Cn vermittelt.

Bisher wurde die Expression, Lokalisation und Funktion myokardialer ER hauptsächlich an Nagetieren untersucht (11-13, 17-19, 23, 33). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression myokardialer ER und deren krankheits- und geschlechtsabhängige Expressionsunterschiede in humanen LV-Myokardproben gezeigt. Die krankheitsabhängig erhöhte Expression der ER in Herzen von Patienten mit AS und DCM könnte auf eine funktionelle Rolle myokardialer ER hinweisen, und der höhere Anstieg der ER-Expression bei Frauen steht gegebenenfalls in Zusammenhang mit den klinischen Vorteilen bei kardiovaskulären Erkrankungen, die beobachtet werden. In der Entwicklung kardialer Hypertrophie spielt auf molekularer Ebene die kalziumabhängige Phosphatase Calcineurin und insbesondere die Isoform CnA beta eine hervorgehobene Rolle (29). In den in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit AS zeigte sich ein zu erwartender Anstieg von CnA beta mRNA (43) und zusätzlich eine signifikante inverse Korrelation zwischen ER beta und CnA beta auf mRNA Ebene. Dieses Phänomen der niedrigen Genexpression von CnA beta bei erhöhter Genexpression von ER beta könnte auf einen der Hypertrophie entgegenwirkenden Mechanismus durch ER beta in humanem Myokard hinweisen.

In einer Arbeit von Taylor et al. wurden ER in multiplen menschlichen Geweben und dabei auch in menschlichem Myokard immunhistochemisch nachgewiesen (16). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die genaue Lokalisation des ER alpha in gesunden und erkrankten Herzen von Frauen und Männern mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie untersucht, sowie die Interaktion von ER alpha mit benachbarten myokardialen Proteinen. Es zeigte sich eine Lokalisation für ER alpha in Zellkernen von Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten, Gefäßendothel- und glatten Muskelzellen. Die Tatsache, daß nicht alle Zellkerne ER alpha Signale aufwiesen, könnte ein Zeichen für eine inhomogene Stimulation der myokardialen Zellen sein. Nuedling et al. zeigten in isolierten Rattenkardiomyozyten ein gestreiftes Muster für ER alpha und eine nukleäre Translokation

der Rezeptoren nach Östrogenstimulation (44). In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigten sich ER alpha Signale im humanen Myokard ebenfalls in gestreifter Anordnung an Plasmamembranen und Glanzstreifen der Kardiomyozyten. Dabei zeigte sich ein abwechselnd gestreiftes Muster für ER alpha und Troponin T und ER alpha und Myosin-Schwerkette. Eine fehlende Kollokalisierung von ER alpha mit Troponin T und Myosin-Schwerkette, beides Bestandteile myofibrillärer Strukturen, verwies auf eine perimysiale Lokalisation des ER alpha.

Eine Membranassoziation eines funktionellen ER alpha ist beschrieben (45). Die Kollokalisierung von ER alpha mit Vinculin, einem myokardialen Strukturprotein des Sarkolemm, welches an Transversaltubuli und Z-Scheiben lokalisiert ist, spricht für einen membranassoziierten ER alpha im humanen Myokard. ER alpha weist keine hydrophoben Anteile auf, die transmembrane Domänen darstellen könnten. Eine direkte intramembranöse Lokalisation scheint daher unwahrscheinlich; eher kann von einer Interaktion mit membranständigen Proteinen in Multi-Protein-Komplexen ausgegangen werden. Eine solche funktionelle Interaktion ist für ER alpha und Caveoline an endothelialen Plasmamembranen beschrieben (46,47). Eine Doppelfärbung von ER alpha mit dem Caveolae Marker Caveolin-3 zeigte jedoch keinen Anhalt für eine Kollokalisierung in myokardialen Caveolae. Dies schließt jedoch eine Interaktion mit anderen caveolären Proteinen, wie zum Beispiel mit eNOS oder iNOS, nicht aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde das ER alpha Signal erstmals an den Glanzstreifen humaner Kardiomyozyten gezeigt. Ropero et al. zeigten das ER alpha Signal an Plasmamembranen und Glanzstreifen in Rattenmyokard (48).

Glanzstreifen bestehen aus „*Gap junctions*“, „*Desmosomen*“ und „*Adhaerens junctions*“. „*Gap junctions*“ regulieren die elektrische Weiterleitung während „*Desmosome*“ und „*Adhaerens junctions*“ Intermediärfilamente integrieren und Myofibrillen ans Sarkolemm verankern. Glanzstreifen sind elementar für eine normale Zell-Zell Interaktion zwischen Myozyten (49). In insuffizienten Herzen sind Glanzstreifen in Struktur und Funktion signifikant verändert (50).

In adultem Myokard bestehen „*Gap junctions*“ zum Großteil aus Connexin 43 (51). Nach Myokardschädigung wird Connexin 43 dephosphoryliert und von den Glanzstreifen ins Zytosol transloziert (52). In Kardiomyozyten von Ratten ist beschrieben, daß E2 via ER an der Phosphorylierung von Connexin 43 beteiligt ist (53). Dies könnte einer Funktion des ER alpha an Glanzstreifen entsprechen. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob ER alpha und Connexin 43 an den Glanzstreifen kollokalisieren. Eine Kollokalisierung für ER alpha und Connexin 43 konnte nicht gezeigt werden, eine gegenseitige Beeinflussung ist jedoch nicht ausgeschlossen. In Herzen von Patienten mit DCM lagen sowohl ER alpha als auch Connexin 43 verringert an Glanzstreifen

vor. Man kann spekulieren, daß ER alpha in gesunden Herzen die Phosphorylierung von Connexin 43 und somit die Lokalisation an den „*Gap junctions*“ begünstigt und diese Funktion in erkrankten Herzen verloren geht.

Ein weiteres Protein an den Glanzstreifen kardialer Myozyten, das Teil der „*Adhaerens junction*“ ist und eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zell-Zell Adhäsionen und intrazellulärem Signaling spielt, ist Beta-Catenin. Beta-Catenin spielt eine Rolle bei der Herzentwicklung (54-56) und bei physiologischer und pathologischer Hypertrophie kardialer Myozyten (57). Eine funktionelle Interaktion zwischen ER alpha und Beta-Catenin wird in verschiedenen Zelltypen wie humanen Darmkrebszellen (58) und hippokampalen Zellen der Ratte (59) beschrieben, wobei eine Lösung von Beta-Catenin aus diesem Komplex durch Östrogenstimulation beschrieben ist (59). Doppelfärbungen ergaben eine deutliche Kolokalisation von ER alpha und Beta-Catenin an den Glanzstreifen gesunder Herzen. In humanen Herzen von Patienten mit DCM und AS hingegen zeigte sich ein Verlust dieser Kolokalisation, da das ER alpha Signal an den Glanzstreifen nicht mehr vorhanden war. Koimmunopräzipitationsexperimente ergaben den Nachweis einer Interaktion zwischen ER alpha und Beta-Catenin in gesunden Herzen. Ein Komplex aus ER alpha und Beta-Catenin im gesunden humanen Myokard scheint daher möglich und ein Fehlen eines solchen Komplexes in Herzen von Patienten mit DCM und AS wahrscheinlich. In dilatierten Herzen ist eine Desorganisation der Proteine an Glanzstreifen beschrieben und vergesellschaftet mit einer Destabilisierung der myokardialen Strukturen mit kontraktile Dysfunktion und Entstehung von Arrhythmien (60-63). Eine stabilisierende Funktion des ER alpha an Glanzstreifen und ein Verlust dieser Funktion im Rahmen der krankheitsabhängigen Umstrukturierung der Glanzstreifen scheint möglich.

Im Tiermodell druckinduzierter LV-Hypertrophie wirkte E2 der Hypertrophie entgegen, wie bereits in vorherigen Studien gezeigt wurde (23,34). Es verminderte die Entstehung einer LV-Dilatation und die Verschlechterung der systolischen Funktion und Kontraktilität. Auf Myozytenebene wirkte E2 inhibierend auf das Längenwachstum, nicht jedoch auf das Breitenwachstum. *In vitro* Experimente mit ER-Antagonisten zeigten, dass die antihypertrophe Wirkung von E2 über ER stattfand.

Der antihypertrophe Effekt von E2 ging einher mit einer Reduktion des Proteingehalts an Calcineurin. Die Tatsache, daß dieser Effekt von E2 in CnA beta knockout Mäusen ausblieb, sprach dafür, dass die Beeinflussung des Calcineurinproteingehaltes ausschlaggebend war für die antihypertrophe Wirkung von E2. Mit Ausbleiben des Proteinanstiegs von Calcineurin durch E2

kam es zu einer Erhöhung der Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von Calcineurin. Somit führte E2-Substitution über ER abhängige Mechanismen zu einer Limitation von LV- und Kardiomyozytenhypertrophie, indem die proteasomale Degradation von Calcineurin erhöht wurde.

Pedram et al. (33) zeigten, dass E2 die Expression des „*modulatory calcineurin interacting protein 1*“, MCIP1, erhöhte und dass die Herunterregulation von MCIP1 durch siRNA den inhibierenden Effekt von E2 auf Agonisten-induzierte Hypertrophie verhinderte. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen damit nicht überein, wobei im Falle der Studie von Pedram Zellkulturversuche mit neonatalen Kardiomyozyten benutzt wurden und in unserer Studie MCIP1 Expression von *in vivo* Myokardproben stammten. Außerdem wurde die MCIP1 Isoform MCIP1.4 quantifiziert, dessen Expression durch NFAT Aktivierung gesteuert wird. MCIP1.4 mRNA Gehalt wurde in Placebo-TAC erhöht, und dies wurde durch E2-Substitution vermindert. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigten, dass MCIP1 die Aktivierung von Calcineurin und somit die pathologische Hypertrophie inhibiert (64-66). MCIP1 Knockout Mäuse hingegen entwickeln erstaunlicherweise weniger druckinduzierte Hypertrophie im TAC-Modell und weniger Calcineurinaktivierung (67), was zu der Annahme führt, dass MCIP physiologischerweise Calcineurinaktivierung und LV-Hypertrophie eher erleichtert als inhibiert. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Rolle der MCIPs in Bezug auf Kardiomyozytenhypertrophie bisher nicht ausreichend geklärt ist und weitere Untersuchungen notwendig sein werden.

Es konnte gezeigt werden, daß E2 die Hypertrophie-induzierte Erhöhung des Calcineurinproteingehalts durch Erhöhung der Calcineurindegradation verhinderte, und dies über einen ER-abhängigen Mechanismus geschieht.

Li et al. zeigten eine Assoziation von Calcineurin mit der E3 Ubiquitin Ligase, Atrogin 1 (42). *In vitro* verhinderte eine Überexpression von Atrogin 1 eine alpha-adrenerg induzierten Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten und *in vivo* eine druckinduzierte LV-Hypertrophie. Gleichzeitig kam es zu einer Verminderung des Proteingehalts und der Aktivität von Calcineurin. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Effekt der E2-Substitution auf Atrogin1 Gehalt festgestellt werden, was eine Beteiligung von Atrogin1 an der antihypertrophen Wirkung von E2 unwahrscheinlich macht. E2 Substitution wirkte jedoch auf die Expression der E3 Ubiquitin Ligasen MDM2 und MuRF1, indem die TAC induzierte Reduktion beider Ligasen verringert wurde. Potentielle Effekte von MDM2 und MuRF1 auf ER-vermittelte Erhöhung der Calcineurindegradation durch E2 bedürfen weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, daß myokardiale ER in humanen Herzen in Zellkernen, an Plasmamembranen und an Glanzstreifen lokalisiert waren, und sie im Myokard von Patienten mit AS oder DCM signifikant erhöht exprimiert und in ihrer Lokalisation verändert vorlagen. Eine in gesunden Herzen bestehende Kolo-kalisation von ER alpha und Beta-Catenin an Glanzstreifen war in Herzen von Patienten mit AS und DCM signifikant reduziert. E2 reduzierte druckinduzierte Kardiomyozytenhypertrophie und LV-Dilatation *in vivo* und *in vitro* und bewirkte dabei eine eher konzentrische Form der Myokardhypertrophie mit Erhalt der LV-Funktion und Kontraktilität. Erstmals konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der proteasomalen Degradation des Proteins Calcineurin bei der antihypertrophen Wirkung von E2 über ER eine Rolle spielt. Die erhöhte Expression von ER im Myokard von Patienten mit AS oder DCM könnte einem Kompensationsmechanismus entsprechen. Frauen zeigten dabei einen stärker ausgeprägten krankheitsabhängigen Anstieg der ER Expression und somit gegebenenfalls einen Vorteil durch Beeinflussung Hypertrophie-assoziiertes Signalwege.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 CIBISII (1999) The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): a randomized trial. *Lancet* 1999;353:9-13.
- 2 Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1397-1402.
- 3 Guerra S, Leri A, Wang X, et al. Myocyte death in the failing human heart is gender dependant. *Circ Res* 1999;85:856-866.
- 4 Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, et al. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation* 1992;86:1099-1107.
- 5 Du XJ. Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res* 2004;63:510-519.
- 6 Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 2003;112:302-307.
- 7 Douglas PS, Otto CM, Mickel MC, et al. Gender differences in left ventricle geometry and function in patients undergoing balloon dilatation of the aortic valve for isolated aortic stenosis. NHLBI Balloon Valvuloplasty Registry. *Br Heart J* 1995;73:548-554.
- 8 Krumholz HM, Larson M, Levy D. Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol* 1993;72:310-313.
- 9 Kostkiewicz M, Tracz W, Olszowska M, et al. Left ventricular geometry and function in patients with aortic stenosis: gender differences. *Int J Cardiol* 1999;71:57-61.
- 10 Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340:1801-1811.
- 11 Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, et al. 17 beta-Estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation* 2004;109:269-276.
- 12 Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17 beta-Estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res* 2004;95:692-699.
- 13 Pedram A, Razandi M, Lubahn D, et al. Estrogen Inhibits Cardiac Hypertrophy: Role of Estrogen Receptor Beta to Inhibit Calcineurin. *Endocrinology* 2008 Mar 27 (epub ahead of print).
- 14 Mendelsohn ME. Genomic and Nongenomic Effects of Estrogen in the Vasculature. *Am J Cardiol* 2002;90(suppl):3F-6F.

- 15 Grohé C, Kahlert S, Löbber K, et al. Modulation of hypertensive heart disease by estrogen. *Steroids*. 1996 Apr;61(4):201-4.
- 16 Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissue. *J Mol Endocrinol* 2000;24:145-155.
- 17 Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, et al. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 1998;156:R1-7.
- 18 Nadal A, Diaz M, Valverde MA. The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News Physiol Sci* 2001;16:251-255.
- 19 Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997;416:107-112.
- 20 Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, et al. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 2004;18:2854-2865.
- 21 Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, et al. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and Beta-Catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:363-373.
- 22 Groten T, Pierce AA, Huen AC, et al. 17 beta-Estradiol transiently disrupts adherens junctions in endothelial cells. *FASEB J* 2005;19:1368-1370.
- 23 van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, et al. 17 beta-Estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2001;104:1419-1423.
- 24 Wilkins BJ, Molkenin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 1;322(4):1178-91.
- 25 Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: Form and Function. *Physiol Rev* 2000;80:1483-1521.
- 26 Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2004;94:110-118.
- 27 Sussman MA, Lim HW, Gude N, et al. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 1998;281:1690-1693.
- 28 Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependant transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998;93:215-228.
- 29 Braz JC, Bueno OF, Liang Q, et al. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest* 2003;111:1475-1486.
- 30 Jovanovic S, Jovanovic A, Shen WK, et al. Low concentration of 17beta-estradiol protect single cardiac cells against metabolic stress-induced Ca<sup>2+</sup> loading. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:948-952.

- 31 Molkenkin JD. Calcineurin and Beyond: Cardiac Hypertrophic Signaling. *Circ Res.* 2000;87:731-738.
- 32 Ullrich ND, Koschak A, MacLeod KT. Oestrogen directly inhibits the cardiovascular L-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep 21;361(2):522-7.
- 33 Pedram A, Razandi R, Aitkenhead M, et al. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in-vitro: Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through Induction of MCIP1. *J Biol Chem* 2005;280:26339-26348.
- 34 Patten R, Pourati I, Aronovitz M, et al. 17 Beta-Estradiol Differentially Affects Left Ventricular and Cardiomyocyte Hypertrophy Following Myocardial Infarction and Pressure Overload. *Journal of Cardiac Failure.* 2008;14:245-253.
- 35 van Eickels M, Patten RD, Aronovitz MJ, et al. 17-Beta-Estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003;41:2084-2092.
- 36 Patten RD, Aronovitz MJ, Einstein M, et al. Effects of angiotensin II receptor blockade versus angiotensin-converting-enzyme inhibition on ventricular remodelling following myocardial infarction in the mouse. *Clin Sci (Lond).* 2003;104:109-18.
- 37 Burkhoff D, Mirsky I, Suga H. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H501-512.
- 38 Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen C-H, et al. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1998;274:H1416-1422.
- 39 Chen X, Shevtsov SP, Hsieh E, et al. The {beta}-Catenin/T-Cell Factor/Lymphocyte Enhancer Factor Signaling Pathway Is Required for Normal and Stress-Induced Cardiac Hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:4462-4473.
- 40 Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17{beta}-Estradiol Reduces Cardiomyocyte Apoptosis In Vivo and In Vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling. *Circ Res.* 2004;95:692-699.
- 41 Jordan M, Wurm F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods: Transfection of Mammalian Cells.* 2004;33:136-143.
- 42 Li HH, Kedar V, Zhang C, et al. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest.* 2004;114:1058-71.
- 43 Ritter O, Hack S, Schuh K, et al. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 2002;105:2265-2269.

- 44 Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, et al. 17 beta-Estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res* 1999;43:666-674.
- 45 Zhang Z, Maier B, Santen RJ, et al. Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:926-933.
- 46 Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, et al. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 2000;87:E44-E52.
- 47 Lu Q, Pallas DC, Surks HK, et al. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17,126-17,131.
- 48 Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, et al. Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:496-510.
- 49 Ehler E, Horowitz R, Zuppinger C, et al. Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J Cell Biol* 2001;153:763-772.
- 50 Perriard JC, Hirschy A, Ehler E. Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:30-38.
- 51 Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, et al. Rapid turnover of connexin 43 in the adult rat heart. *Circ Res* 1998;83:629-635.
- 52 Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin 43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 2000;87:656-662.
- 53 Chung TH, Wang SM, Wu JC. 17 beta-Estradiol reduces the effect of metabolic inhibition on the gap junction intercellular communication in rat cardiomyocytes via estrogen receptor. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:1013-1022.
- 54 Hurlstone A, Haramis AP, Wienholds E, et al. The Wnt/Beta-Catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* 2003;425:633-637.
- 55 Kioussi C, Briata P, Baek SH, et al. Identification of a Wnt/Dvl/ $\beta$ -catenin-Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 2002;111:673-685.
- 56 Liebner S, Cattelino A, Gallini R, et al.  $\beta$ -Catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* 2004;166:359-367.

- 
- 57 Chen X, Shevtsov SP, Hsich Eileen, et al. The Beta-Catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* 2006;26:4462-4473.
- 58 Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, et al. Wnt/Beta-Catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:40,255-40,258.
- 59 Cardona-Gomez P, Pere M, Avila J, et al. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3 and Beta-Catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:363-373.
- 60 Severs NJ, Coppin SR, Dupont E, et al. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* (2004) 62:368–377.
- 61 Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, et al. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* (2001) 88:333–339.
- 62 Gutstein DE, Morley GE, Vaidya D, et al. Heterogeneous expression of gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction. *Circulation* (2001) 104:1194–1199.
- 63 Dupont E, Matsushita T, Kaba R, et al. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* (2001) 33:359–371.
- 64 Yang J, Rothermel B, Vega RB, et al. Independent Signals Control Expression of the Calcineurin Inhibitory Proteins MCIP1 and MCIP2 in Striated Muscles. *Circ Res*. 2000;87:61e-68.
- 65 Rothermel B, Vega RB, Yang J, et al. A Protein Encoded within the Down Syndrome Critical Region Is Enriched in Striated Muscles and Inhibits Calcineurin Signaling. *J. Biol. Chem*. 2000;275:8719-8725.
- 66 Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, et al. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *PNAS*. 2001;98:3328-3333.
- 67 Sanna B, Brandt EB, Kaiser RA, et al. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *PNAS*. 2006;103:7327-7332.

## 7. Ausgewählte Publikationen und Anteilserklärung

- 1.) Nordmeyer J \*, Eder S \*, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J, Bethke N, Zurbrügg HR, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Upregulation of Myocardial Estrogen Receptor in Human Aortic Stenosis. *Circulation*. 2004;110:3270-3275.

[Impact factor: 12.6]

Frau Nordmeyer, geb. Eder, hat an dieser Publikation einen Eigenanteil von 45%: Planung und Durchführung von Proteinaufarbeitung, Western-Blot und Immunhistochemie. Erhebung der klinischen Daten der untersuchten Patienten. Interpretation der Ergebnisse im molekularen und klinischen Kontext und Verfassung des Manuskriptes.

- 2.) Mahmoodzadeh S \*, Eder S \*, Nordmeyer J \*, Ehler E, Huber O, Martus P, Weiske J, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Estrogen receptor alpha upregulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J*. 2006;20:926-934.

[Impact factor: 6.7]

Frau Nordmeyer, geb. Eder, hat an dieser Arbeit einen Eigenanteil von 40%: Planung und Durchführung von Proteinaufarbeitung, Western-Blot und Immunhistochemie. Erhebung der klinischen Daten der untersuchten Patienten. Interpretation der Ergebnisse im molekularen und klinischen Kontext und Redaktion des Manuskriptes.

- 3.) Donaldson C \*, Eder S \*, Baker C \*, Aronovitz MJ, Weiss AD, Hall-Porter M, Wang F, Ackerman A, Karas RH, Molkentin JD, Patten RD. Estrogen Attenuates Left Ventricular and Cardiomyocyte Hypertrophy by an Estrogen Receptor-Dependent Pathway that Increases Calcineurin Degradation. *Circ Res*. 2009 Jan 30;104(2):265-75

[Impact factor 2008: 10]

Frau Nordmeyer, geb. Eder, hat an dieser Arbeit einen Eigenanteil von 30%: Planung und Durchführung der Zellkultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit Stimulationsexperimenten und Luziferase-Assays, Proteinaufarbeitung, sowie Western-Blot. Interpretation der Ergebnisse im molekularen Kontext und Redaktion des Manuskriptes.

\* geteilte Erstautorenschaften

## **8. Anhang**

### **8.1 Lebenslauf**

#### **C U R R I C U L U M V I T A E**

**Sarah Maria Nordmeyer, geb. Eder**

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

## 8.2 Publikationsliste

- Posterpräsentation auf dem ESC-Kongreß in Barcelona 2009; “Reduced left ventricular (LV) regional function is related to LV wall scar tissue late after ALCAPA repair”, Eder S, Alexi-Meskishvili V, Schmitt B, Nasserli B, Ewert P, Hetzer R, Berger F
- Cameron D, Eder S, Baker C, et al.; Estrogen Attenuates Left Ventricular and Cardiomyocyte Hypertrophy by an Estrogen Receptor-Dependent Pathway that Increases Calcineurin Degradation. *Circ Res.* 2009 Jan 30;104(2):265-75.
- Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Eder S, Force T, Mendelsohn ME, Karas RH; 17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. *J Card Fail.* 2008 Apr;14(3):245-53.
- Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, et al.; Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB Journal.* 2006 May; 20(7):926-34
- Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, et al.; Upregulation of Myocardial Estrogen Receptors in Human Aortic Stenosis. *Circulation.* 2004; 110:3270-3275
- Vortrag auf dem European’s Students Conference 2003, Charité Universitätsmedizin Berlin; „Regulation of myocardial Estrogen receptors in Human Aortic Stenosis and Cardiomyopathies“.

### **8.3 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Sarah Maria Nordmeyer, geb. Eder, an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 22.10.2009

---

Sarah Maria Nordmeyer

## 8.4 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek, die mich während meiner Arbeit im Labor und bei meinem Vorhaben, meine wissenschaftlichen Erfahrungen im Forschungslabor von Michael Mendelsohn am Tufts – New England Medical Center in Boston, USA, zu erweitern, stets unterstützt hat. Mein besonderer Dank gebührt außerdem Frau Dr. Shokufeh Mahmoodzadeh, meiner in Geduld erprobten direkten Ansprechpartnerin und Betreuerin.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich Herrn Prof. Dr. Martus aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, danken.

Britta Hannack (MTA) und Jenny Thomas (MTA) danke ich für technische Einarbeitung in die Laborarbeit.

Herrn Dr. Rudi Lurz, Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin, danke ich für die Nutzung des Konfokalmikroskopes bis tief in die Nacht.

Meiner Mitdotorandin Nicole Bethke möchte ich für die vielen langen Abende und „Pizza auf dem Gang“ danken.

Für einen sehr informativen und wissenschaftlich förderlichen Forschungsaufenthalt in ihrem Labor am King's Kollege London danke ich Frau Dr. Elisabeth Ehler.

Herrn Dr. Michael Mendelsohn, dem Leiter des „Molecular Cardiology Research Institute“ in Boston, möchte ich für die Möglichkeit danken, in seinem Labor die antihypertrophe Wirkung von Östrogen näher untersuchen zu können.

Herrn Dr. Richard Patten, meinem Betreuer in Boston, danke ich für die wissenschaftliche Förderung und seinen Humor.

Dem „Biomedical Sciences Exchange Program“ (BMEP) gilt mein Dank für die organisatorische und finanzielle Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes in Boston.

Ich danke meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben, meine Vorhaben zu realisieren und meinem Bruder Philipp, der mir maßgeblich bei dem Layout dieser Arbeit behilflich war. Meinem Mann danke ich für seine stete positive Motivation, den wissenschaftlichen Austausch und viele humorvolle Stunden.