

Aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Östrogenrezeptoren im humanen linksventrikulären Myokard –
eine neue molekulare Komponente bei kardialer Hypertrophie und
Herzinsuffizienz**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Nordmeyer

aus Freiburg i. Br.

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

2. Prof. Dr. H. Jarry

3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Tschöpe

Datum der Promotion: 14.12.2007

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Östrogenrezeptoren und linksventrikuläre Hypertrophie	8
1.2 Östrogenrezeptoren und Herzinsuffizienz	9
1.3 ER-Polymorphismen und kardiovaskulärer Phänotyp	10
1.4 17beta-Estradiol, kardiale Fibroblasten und Herzinsuffizienz	10
1.5 Zielsetzung und Fragestellungen	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Patientengut	13
2.2 Chemikalienliste	17
2.3 Geräteliste	19
2.4 Pufferansetzungen	20
2.5 Strategie der Probenverwendung	21
2.6 RNA-Extraktion und Herstellung von cDNA	22
2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
2.8 Sequenzierungs-Analyse	29
2.9 Protein-Extraktion	31
2.10 Western-Blot-Verfahren	32
2.11 Zellkultur mit humanen kardialen Fibroblasten	35
2.12 Statistik	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Regulation von ER mRNA in humanen Myokardproben	39
3.2 Regulation von ERalpha Protein in humanen Myokardproben	50
3.3 Analyse eines SNP in Exon 4 des für ERalpha kodierenden Gens	56
3.4 Stimulation humaner, kardialer Fibroblasten mit 17beta-Estradiol	60
4. Diskussion	65
4.1 ER bei linksventrikulärer Hypertrophie durch Aortenklappenstenose	66
4.2 ER bei Herzinsuffizienz	68
4.3 ER in Spenderherzen	69
4.4 ERalpha-SNP und kardialer Phänotyp	70
4.5 17beta-Estradiol und Endothelin - „Achse“	71
4.6 Limitationen der experimentellen Arbeit	72
4.7 Zusammenfassung	73
5. Abkürzungsverzeichnis	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Erklärung	85
8. Danksagungen	86
9. Lebenslauf	87
10. Publikationsliste	88

1 Einleitung

Immer häufiger werden bei Untersuchungen von Herz-Kreislaufkrankungen Geschlechterunterschiede gefunden, so auch in klinischen und tierexperimentellen Studien zu linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Sexualhormone und/oder deren Rezeptoren gehören zu den interessantesten Kandidaten, die zu diesen Befunden beitragen könnten. Während zu Androgenrezeptoren wenige Informationen vorliegen, fand die Rolle von Östrogenrezeptoren (ER) im kardiovaskulären System in den letzten Jahren vermehrte Aufmerksamkeit.

Die ER alpha und beta gehören zu der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie. Beide ER sind in kardialen Fibroblasten und Myozyten von Ratten exprimiert¹ und wurden auch in menschlichen Herzen nachgewiesen². Als Mitglieder der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie können ER als Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene modulieren³. Zusätzlich können sie auch schnelle Effekte erzielen, denen keine Veränderungen in der Genexpression zugrunde liegen³. Dazu gehört beispielsweise die schnelle Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)⁴.

Beide ER besitzen eine ähnliche Molekularstruktur, die sechs Domänen (A bis F)^{5,6}, Abb. 1.1) aufweist. In der DNA-bindenden Domäne C liegt dabei die höchste Homologie vor (96%)^{3,7}. Es bestehen aber Unterschiede in den aktivierenden Domänen 1 und 2 (AF-1 und AF-2)³, an welchen die ER mit Liganden und Cofaktoren interagieren^{8,9}. Daraus können unterschiedliche Funktionen der beiden ER resultieren⁵.

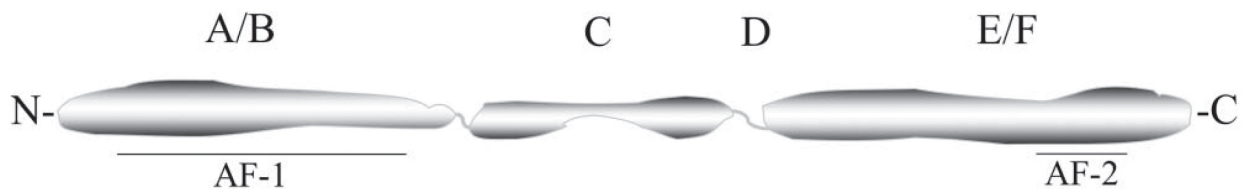


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von ER nach Zitat [6].

Die Aktivierung von ER kann entweder über Ligandenbindung mit Östrogenen stattfinden oder durch Phosphorylierungen der aktivierenden Domänen¹⁰, vor allem an Serin-Resten von AF-1¹¹. Letzteres kann durch Proteinkinasen geschehen, die durch Wachstumsfaktoren reguliert werden^{11,12}. Diese Form der ER-Aktivierung tritt vor allem dann auf, wenn die lokale Konzentration von Wachstumsfaktoren hoch ist oder wenn die Serum-Östrogen-Spiegel niedrig sind, wie bei Männern oder bei Frauen nach der Menopause³.

1.1 Östrogenrezeptoren und linksventrikuläre Hypertrophie

In einer klinischen Studie über kardiale Anpassungsmechanismen an Aortenklappenstenose wurde erstmals auf einen möglichen Geschlechterunterschied in der Entwicklung linksventrikulärer Hypertrophie hingewiesen, denn die Herzen der weiblichen Patienten zeigten im Vergleich zu denen der männlichen trotz ähnlicher Druckbelastung (Nachlast) eine niedrigere endsystolische Wandspannung und eine bessere Funktion¹³. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb exemplarisch das Krankheitsbild der Aortenklappenstenose (AS) als Modell für Geschlechterunterschiede bei linksventrikulärer Hypertrophie herangezogen und in ihm die Rolle von ER untersucht werden.

Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien lassen vermuten, dass ER in die molekulare Beeinflussung von kardialer Hypertrophie involviert sind. Es gibt Hinweise darauf, dass ER-vermittelte Signale die intrazelluläre Calcium (Ca^{2+})-Verfügbarkeit in Herzmuskelzellen kontrollieren und somit deren hypertrophes Wachstum regulieren können. Eine genetische Deletion von ER in Mäusen führte zu einem Anstieg der L-Typ Ca^{2+} -Kanal Expression in ventrikulären Herzmuskelzellen¹⁴, und in einer anderen Studie reduzierte die Gabe von Östrogen die Aktivität dieses Ca^{2+} -Kanals¹⁵.

Auch in einem experimentellen Tiermodell für Aortenstenose, in welchem Mäusen der Aortenbogen eingeschnürt wurde (TAC, „Transverse Aortic Constriction“), zeigten sich Effekte von ER. Die Gabe von 17beta-Estradiol schwächte die Entwicklung von Druckbelastungs-induzierter linksventrikulärer Hypertrophie in ovariectomierten Weibchen und verhinderte die Aktivierung von p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)¹⁶, die als Hypertrophie-fördernd gelten¹⁷. Weiterhin erhöhte die Aktivierung von ER in Herzmuskelzellen von neonatalen Ratten die Gentranskription des atrialen natriuretischen Peptids (ANP)¹⁸, welches auf molekularer Ebene über die Regulation von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) Hypertrophie-hemmend wirkt¹⁹.

In menschlichen Herzen fanden sich bisher jedoch nur indirekte Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von ER. Postmenopausale Frauen mit arterieller Hypertonie, die zusätzlich zur Standard-Medikation Hormontherapie (HT) einnahmen, zeigten weniger linksventrikuläre Hypertrophie als die Patientinnen ohne HT²⁰. Außerdem erhöhte HT den Plasmaspiegel von „brain natriuretic peptide“ (BNP)^{21,22}, welches ähnlich dem ANP kardiale Hypertrophie beeinflussen kann^{19,23}. Die Untersuchung der Expression und Regulation von ER in Herzen von Patienten mit AS könnte weitere Hinweise auf mögliche molekulare Mechanismen von Geschlechterunterschieden bei linksventrikulärer Hypertrophie liefern.

1.2 Östrogenrezeptoren und Herzinsuffizienz

In klinischen Studien überlebten Frauen mit Herzinsuffizienz länger als Männer mit der gleichen Erkrankung²⁴⁻²⁶. In Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz war dieser Befund besonders ausgeprägt, wenn die Herzinsuffizienz nicht ischämiebedingt war (FIRST-²⁷ und BEST-Studie²⁶). Als Modell für Geschlechterunterschiede bei Herzinsuffizienz sollte deshalb die dilatative Kardiomyopathie (DCM) weiter untersucht werden.

Geschlechterunterschiede bei Herzinsuffizienz konnten auch in Tiermodellen nachgewiesen werden. So starben in verschiedenen transgenen Tiermodellen die männlichen Tiere früher an Herzinsuffizienz als die weiblichen Tiere²⁸, und bei Relaxin-defizienten Mäusen prägten nur die Männchen einen pathologischen Phänotyp aus²⁹.

Die Bedeutung von ER bei Herzinsuffizienz wurde nur in wenigen tierexperimentellen Studien untersucht, zumeist nach Myokardschädigung durch Ischämie. In einem Mausmodell mit einer Deletion von ERalpha (ERKO) in Männchen wurden deren Herzen komplett entnommen, für 45 Minuten in einer kardioplegischen Lösung inkubiert und dann wieder reperfundiert³⁰. Diese globale Myokardischämie führte bei den ERKO-Mäusen zu stärkerer Myokardschädigung als bei den Wildtyp-Mäusen³⁰. Weiterhin erhöhte eine Deletion von ERbeta (BERKO) in weiblichen Mäusen deren Mortalität bei chronischer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt³¹. In einer anderen Studie mit ovariectomierten weiblichen Mäusen nach Myokardinfarkt aktivierte die Gabe von 17beta-Estradiol einen ER-Proteinkinase B (Akt)-abhängigen Signalweg, der die Apoptose in Herzmuskelzellen reduzierte³²⁻³⁴.

Die Regulation der Apoptose scheint auch in menschlichen Herzen ein Mechanismus zu sein, der zu Geschlechterunterschieden beitragen kann, denn in Herzmuskelzellen von alten Frauen trat weniger Apoptose auf als bei Männern³⁵. Ergebnisse aus klinischen Studien lassen bisher nur indirekt auf eine Bedeutung von ER schließen. Die Einnahme von HT oder Östrogen führte bei herzinsuffizienten Frauen nach der Menopause - in allerdings diesbezüglich nicht randomisierten Studien - unabhängig von der Ursache der Erkrankung (ischämisch oder nicht-ischämisch) zu einer Reduktion der kardialen Mortalität^{36,37}. Die Untersuchung der Expression und Regulation von ER in Herzen von Patienten mit DCM könnte weitere Hinweise auf mögliche molekulare Mechanismen von Geschlechterunterschieden bei Herzinsuffizienz liefern.

1.3 ER-Polymorphismen und kardiovaskulärer Phänotyp

Inzwischen konnten Polymorphismen in beiden ER-Genen mit kardiovaskulären Phänotypen assoziiert werden. Im ERalpha-Gen wurde in einer Meta-Analyse von fünf unabhängigen Studien ein Polymorphismus (454-397 T>C) mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt bei Männern verbunden³⁸. Im ERbeta-Gen waren zwei Polymorphismen nur bei Frauen mit der linksventrikulären Masse und Wanddicke assoziiert³⁹. Weiterhin waren ER-Polymorphismen auch mit Adipositas⁴⁰ und Blutdruck-Regulation⁴¹ assoziiert. Die Analyse von ER-Polymorphismen könnte helfen, weitere Erkenntnisse zur Klärung von Geschlechterunterschieden bei linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu erhalten.

1.4 17beta-Estradiol, kardiale Fibroblasten und Herzinsuffizienz

Kardiale Fibroblasten besitzen funktionelle ER^{1,42-44}. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle im Rahmen des kardialen „Remodeling“, eines strukturellen Anpassungsmechanismus an Veränderungen der kardialen Vor- und Nachlast, wie sie auch bei Herzinsuffizienz auftreten. Kardiale Fibroblasten kontrollieren Produktion und Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) und beeinflussen über deren Zusammensetzung die systolischen und diastolischen Eigenschaften des Herzmuskels. Das Ausmaß des Remodeling wird durch Neurohormone gesteuert, die bei Herzinsuffizienz erhöhte Plasmaspiegel aufweisen. Dazu gehört das Peptidhormon Endothelin-1 (ET-1)^{45,46}, welches in menschlichen kardialen Fibroblasten vorwiegend über seinen ET_A-Rezeptor die verstärkte Bildung von EZM bewirken kann⁴⁷. Überschüssendes Remodeling kann zu Fibrose und Versteifung des Herzmuskels führen und somit die Herzinsuffizienz weiter verstärken⁴⁸.

Da es bisher keine Evidenz für veränderte Östrogen-Plasmaspiegel bei Herzinsuffizienz gibt, ist ein direkter Einfluss von 17beta-Estradiol über veränderte Plasmaspiegel auf die EZM-Produktion in kardialen Fibroblasten unwahrscheinlich. Hingegen könnte 17beta-Estradiol über die Modulation einer parakrinen/autokrinen neurohormonellen Achse einen indirekten Einfluss auf das kardiale Remodeling nehmen. Ein möglicher Hinweis darauf fand sich in einer Studie mit kardialen Fibroblasten aus neonatalen Ratten, denn dort reduzierte 17beta-Estradiol die durch Angiotensin II vermittelte Genexpression von ET-1⁴⁹. Stimulationsexperimente mit kardialen Fibroblasten aus explantierten Herzen von herzinsuffizienten Patienten könnten zur Klärung dieser Hypothese weiter beitragen.

1.5 Zielsetzung und Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Verständnis der molekularen Mechanismen von Geschlechterunterschieden bei Herz-Kreislaufkrankungen zu erweitern. Dazu sollten mehrere Fragestellungen zu Östrogenrezeptoren bearbeitet werden, um Hinweise auf deren Bedeutung für die Pathophysiologie und für Geschlechterunterschiede bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu erhalten.

- In einer ersten Studie sollte die mRNA-Expression von ERalpha und ERbeta in linksventrikulären Myokardproben untersucht werden. Befunde aus Spenderherzen sollten zunächst mögliche Einflüsse von Alter und Geschlecht auf die ER-Expressionshöhe abgrenzen. Dann sollte die Regulation von ER in Myokardproben von Patienten mit AS und DCM untersucht werden, um die Krankheitsabhängigkeit der ER-Genexpression zu überprüfen. Mit der oben genannten Strategie sollte weiterhin untersucht werden, in welcher Weise das ERalpha Protein in den Patientengruppen reguliert wird.
- Anschließend sollten die erhaltenen Werte für die ERalpha- und ERbeta-Expression auf Korrelationen mit klinischen Parametern, sowie Hypertrophie- und Herzinsuffizienz-assoziierten Genen untersucht werden, um Hinweise auf mögliche molekulare Mechanismen zu erhalten.
- Eine mögliche Bedeutung von Polymorphismen in den ER-Genen wurde in einem bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auffälligen „single-nucleotide-polymorphism“ (SNP) in Exon 4 des für ERalpha kodierenden Gens untersucht. Analysiert werden sollte, ob ein Zusammenhang zwischen Allelfrequenz, Geschlecht und kardialem Phänotyp besteht und ob dieser SNP mit der Expressionshöhe von ERalpha assoziiert werden kann.
- In einer Zellkulturstudie sollte die Wirkung von 17beta-Estradiol auf die Expression von ET-1 und ET_A-Rezeptor in kardialen Fibroblasten aus explantierten Herzen von herzinsuffizienten Patienten untersucht werden. Diese Studie sollte zugleich überprüfen, ob 17beta-Estradiol eine indirekte Rolle beim kardialen Remodeling spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

In der vorliegenden Arbeit wurden linksventrikuläre Myokardproben aus menschlichen Herzen untersucht. Diese stammten sowohl von Patienten mit Aortenklappenstenose (AS) als auch von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM). Als Kontrollgruppe dienten Myokardproben von nicht verwendeten Spenderherzen mit normaler systolischer Pumpfunktion. Die Myokardproben wurden entweder bei orthotoper Herztransplantation oder im Rahmen einer elektiven Operation zum Aortenklappenersatz am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) gewonnen. Alle Patienten erteilten dazu ihr Einverständnis nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung.

Die Studie wurde im Rahmen eines vom Ethikkomitee der Universitätsklinik Rudolf-Virchow genehmigten Protokolls durchgeführt und entspricht der Deklaration von Helsinki.

2.1.1 Logistische Überlegungen

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von menschlichen Myokardproben konnten ER-mRNA und ERalpha-Protein nicht in allen Proben untersucht werden. In der Mehrzahl der Patienten konnten die Proben mit beiden Verfahren untersucht werden (Tab. 2.1). Alle klinischen Parameter, sowie die kardiovaskuläre Medikation unterschieden sich nicht signifikant in den so entstandenen Untergruppen. Die Daten wurden deshalb für die gesamte AS- und DCM-Patientengruppe gemeinsam dargestellt (Tab. 2.3 und 2.4).

Tab. 2.1 Anzahl der Myokardproben, dargestellt nach Untersuchungs-Verfahren

Untersuchungs-Verfahren	Anzahl der untersuchten Proben		
	Kontrollgruppe	AS	DCM
A: ERalpha- und ERbeta-mRNA	24	14	24
B: ERalpha-Protein	16	11	27
mRNA und Protein (Überlappung A+B)	24 (100%)	17 (73%)	37 (58%)

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

Für die Zellkultur-Experimente wurden kardiale Fibroblasten von sechs Patienten verwendet, deren individuelle klinische Daten in Tab. 2.2 dargestellt sind.

2.1.1.1 Einteilung in Altersgruppen

Die Patienten wurden nach Diagnose, Geschlecht und Alter (\leq und >50 Lebensjahre [LJ]) in Gruppen eingeteilt. Damit sollte der Einfluß dieser Merkmale auf die Expressionshöhe von ER untersucht werden. Die Altersgrenze wurde auf 50 LJ festgelegt, weil in der westlichen Zivilisation das Durchschnittsalter für das Erreichen der Menopause, je nach Geburtsjahrgang, mit 49-51 LJ angegeben wird⁵⁰.

2.1.1.2 Erhebung der klinischen Daten

Die klinischen Daten zeigen die letzten dokumentierten Echokardiografie- und/oder Herzkatheter-Befunde der linksventrikulären Funktion vor der entsprechenden Operation.

Die kardiovaskuläre Medikation und der Gebrauch von Hormontherapie (HT) wurde den Patientenakten entnommen, bei unvollständigen Angaben erfolgten Rückfragen.

2.1.2 Beschreibung der AS-Patientengruppe

In der AS-Patientengruppe wurden Myokardproben von insgesamt 17 Patienten untersucht (Tab. 2.3), darunter acht von Frauen und neun von Männern. Im Alter von ≤ 50 LJ war eine Patientin, die übrigen 16 (weiblichen wie männlichen) Patienten gehörten zur Altersgruppe >50 LJ.

Der mittlere Druckgradient über der Aortenklappe (δp mean) war in der gesamten AS-Patientengruppe mit 48.1 ± 2.4 mmHg deutlich erhöht. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) betrug 49.6 ± 5.2 %, die fraktionelle Verkürzung (FS) 27.4 ± 3.0 %, der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) 55.4 ± 2.6 mm und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) 24.3 ± 3.0 mmHg.

Als Medikation erhielten 88 % der Patienten ein Diuretikum, 63 % ein Präparat zur Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS-Antagonist, Hemmer des Angiotensin-Conversions-Enzyms oder AT_1 -Rezeptor-Blocker), 56 % einen Betablocker, sowie 25 % ein Digitalis-Präparat. Zwei Patientinnen nahmen Hormontherapie (HT) ein.

2.1.3 Beschreibung der DCM-Patientengruppe

In der DCM-Gruppe wurden Myokardproben von insgesamt 37 Patienten untersucht (Tab. 2.4), darunter drei von Frauen und 34 von Männern. Zur Altersgruppe ≤ 50 LJ gehörten eine Patientin und 25 Patienten, zur Altersgruppe >50 LJ die verbleibenden (weiblichen wie männlichen) Patienten. 12 von 37 Patienten (32 %) bekamen vor der Herztransplantation vorübergehend eine ventrikuläre Herzunterstützungspumpe (VAD) implantiert.

Die linksventrikuläre Funktion war in der gesamten DCM-Gruppe erheblich eingeschränkt, alle Patienten waren terminal herzinsuffizient. Die mittlere LVEF betrug 24.3 ± 3.1 %, die korrespondierende FS 10.5 ± 0.8 % und der LVEDD 75.3 ± 1.5 mm.

Als Medikation erhielten 100 % der Patienten ein Diuretikum, 95 % einen RAS-Antagonisten, 89 % einen Betablocker, sowie 89 % ein Digitalis-Präparat. HT wurde bei keiner Patientin aus der DCM-Patientengruppe eingesetzt.

2.1.4 Beschreibung der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurden Myokardproben von insgesamt 24 Spendern untersucht (47.0 ± 3.3 Jahre). Davon waren 10 Frauen, drei von ihnen ≤ 50 LJ und sieben > 50 LJ (28.1 ± 5.2 vs. 57.3 ± 2.5 Jahre). Weiterhin wurden Myokardproben von 14 Männern untersucht, davon sieben ≤ 50 LJ und sieben > 50 LJ (32.2 ± 4.9 vs. 59.4 ± 1.1 Jahre).

Dokumentierte klinische Daten oder Angaben über die Medikation lagen nicht vor.

2.1.5 Klinische Daten - Zellkultur-Experimente

Kardiale Fibroblasten wurden aus linksventrikulären Myokardproben von sechs Patienten isoliert. Vier Patienten mussten sich infolge einer DCM, ein Patient infolge einer ischämischen Kardiomyopathie (ICM) und ein Patient infolge einer restriktiven Kardiomyopathie (rKMP) einer orthotopen Herztransplantation unterziehen (Tab. 2.2).

Tab. 2.2 Individuelle klinische Daten - Zellkultur-Experimente

	Diagnose	Alter	Sex	VAD	LVEDD [mm]	LVEF [%]	FS [%]	Diuretikum	RAS-Antagonist	Beta-Blocker	Digitalis
Pat.1	DCM	14	W	-	48	18	6	+	+	+	+
Pat.2	DCM	33	M	DeBakey	59	19	7	+	+	+	+
Pat.3	DCM	57	M	DeBakey	80	27	10	+	+	+	+
Pat.4	DCM	60	M	-	69	37	21	+	+	+	+
Pat.5	ICM	57	M	-	69	20	7	+	+	+	+
Pat.6	rKMP	32	M	-	57	57	25	+	-	+	+

VAD: ventrikuläre Herzunterstützungspumpe (hier: Typ DeBakey), +: Therapie eingesetzt, -: Therapie nicht eingesetzt. Übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

Tab. 2.3 Klinische Daten und Medikation in der untersuchten AS-Patientengruppe

Patientengruppe		n	Alter [Jahre]	δp mean [mmHg]	LVEF [%]	LVESD [mm]	FS [%]	LVESD [mmHg]	Diuretika [%]	RAS-Antagonist [%]	Beta-Blocker [%]	Digitalis [%]
AS	$\leq 50LJ$	1	47.0 \pm 0.0	53.0 \pm 0.0	-	43.0 \pm 0.0	44.0 \pm 0.0	-	100	0	0	0
	> 50LJ	7	69.6 \pm 4.5	50.4 \pm 3.2	60.8 \pm 8.0	52.0 \pm 2.8	31.2 \pm 4.7	21.5 \pm 3.1	71	57	57	29
	Σ	8	66.8 \pm 4.8	50.8 \pm 2.8	60.8 \pm 8.0	50.9 \pm 2.6	33.0 \pm 4.3	21.5 \pm 3.1	75	50	50	25
	> 50LJ	9	68.6 \pm 1.4	45.0 \pm 4.1	41.6 \pm 5.5	60.0 \pm 4.1	22.5 \pm 3.5	26.6 \pm 4.8	100	75	63	25
	Σ	9	68.6 \pm 1.4	45.0 \pm 4.1	41.6 \pm 5.5	60.0 \pm 4.1	22.5 \pm 3.5	26.6 \pm 4.8	100	75	63	25
gesamt	17	67.7 \pm 2.3	48.1 \pm 2.4	49.6 \pm 5.2	55.4 \pm 2.6	27.4 \pm 3.0	24.3 \pm 3.0	88	63	56	25	

Tab. 2.4 Klinische Daten und Medikation in der untersuchten DCM-Patientengruppe

Patientengruppe		n	Alter [Jahre]	δp mean [mmHg]	LVEF [%]	LVESD [mm]	FS [%]	LVESD [mmHg]	Diuretika [%]	RAS-Antagonist [%]	Beta-Blocker [%]	Digitalis [%]
DCM	$\leq 50LJ$	1	38.0 \pm 0.0	-	10.0 \pm 0.0	82.0 \pm 0.0	8.0 \pm 0.0	-	100	100	100	100
	> 50LJ	2	61.0 \pm 4.0	-	21.0 \pm 0.0	75.0 \pm 4.0	14.5 \pm 0.5	-	100	50	100	100
	Σ	3	53.7 \pm 8.2	-	15.5 \pm 5.5	77.3 \pm 3.3	12.3 \pm 2.2	-	100	67	100	100
	$\leq 50LJ$	25	41.7 \pm 1.7	-	22.5 \pm 3.8	75.1 \pm 2.0	10.1 \pm 1.0	-	100	96	84	84
	> 50LJ	9	54.6 \pm 1.0	-	33.5 \pm 6.4	75.2 \pm 2.6	10.8 \pm 1.4	-	100	100	100	100
Σ	34	45.1 \pm 1.6	-	25.5 \pm 3.4	75.1 \pm 1.6	10.3 \pm 0.8	-	100	97	88	88	
gesamt	37	45.8 \pm 1.6	-	24.3 \pm 3.1	75.3 \pm 1.5	10.5 \pm 0.8	-	100	95	89	89	

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5), Σ : Patientenzahl in der Untergruppe.

2.2 Chemikalienliste

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysi.

Chemikalie	Hersteller
17beta-Estradiol	Sigma
5*RT-Puffer	Invitrogen
Acrylamidmix	Roth
Agarose	Biozym
Albumin Standard	Perbio/ PIERCE
APS	Roth
BCA Protein Assay	Perbio/ PIERCE
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Blocking Reagenz	Chemicon
BSA	Sigma
Chloroform	Roth
Collagenase	Worthington biochemical corporation
DEPC	Sigma
Dispase	Gibco BRL
DNase I RNase-frei	Boehringer Mannheim
dNTPs	Promega
DTT	Gibco BRL
Dulbecco´s MEM, phenolrotfrei	PAA
Dulbecco´s MEM, phenolrothaltig	PAA
ECL	Amersham Life Science
EDTA	Sigma
Eisessig	Sigma Aldrich
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics
FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics
FCS	PAA
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
HEPES	PAA
Hybridisierungssonden	TibMolBiol
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Methanol	Roth
MgCl ₂ (25mM)	Roche Diagnostics
Millipore-H ₂ O	Milli-Q UF Plus
MnCl ₂ (8mM)	Roth
NaCl	Roth
Nonident P-40	Sigma
PBS	PAA

(Weiterführung von 2.2 Chemikalienliste)

Chemikalie	Hersteller
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	PAA
PMFS	Sigma
Ponceau Rot-S	Sigma
Primer	TibMolBiol, BioTez
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Sigma
Random-Hexamer-Primer	Gibco BRL
Rnasin	Promega
RNAZOL B	Invitrogen
Rotiload 2	Roth
Rotimark (pre-stained)	Roth
SDS	Roth
Sepharose / Sephadex G50	Pharmacia
Steriles H ₂ O	Roche Diagnostics
Superscript (200U/μl)	Gibco BRL
TBE-Puffer	Qbiogene
TEMED	Roth
Tris HCl	Roth
TRIS-Base	Roth
Trypsin	Invitrogen
Trypsin EDTA	PAA
Tween20	Merck

2.3 Geräteliste

Gerät	Hersteller
1.5ml Eppendorff Reaktionsgefäß	Eppendorff
96-Well-ELISA-Platte	Biozym
Absaug-Apparatur für Zellkulturabfälle	KNF Neuberger, Schott
Durchsichtscanner (ScanJet 4600 mit Transparenzadapter)	HP
Elektrophoresekammern	Biozym, Gibco, Life Technologies
Elektrophorese-Spannungsquellen	Amersham Pharmacia, EPS 301/200
ELISA Platten Reader (MTX Spectramax 250)	MTX
Entwicklermaschine (Protec 45 compact Typ 1120)	Protec
Falcon-Röhrchen (10ml, 50ml)	Falcon
FastPrep-Gerät (FP 120)	Savant
Fein-Waagen (PG5002 Delta Range, AE260 Delta Range)	Mettler Toledo
Gelvorrichtung (DPR)	VWR
GeneAmp 9600™	Applied Biosystems
Hybridisierungsöfen	Bachofer
Kapillarsequenzierer ABI 370™	Perkin Elmer
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge	Eppendorff
LightCycler™	Roche Diagnostics
LightCycler-Glaskapillaren	Roche Diagnostics
LysisMatrix TypA™ und Typ D™	Qbiogene
Microcon Säule	Amicon
Mikrowelle	Bosch
Multipipette	Eppendorff
Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL)	Amersham Pharmacia
Photometer (Ultrospec 2000)	Pharmacia Biotech
Pipetten	Eppendorff, Labsys
Pipettenspitzen	Eppendorff
Röntgenfilm (Kodax Biomax Light-1)	Kodax
Röntgenfilm-Kassette (Hypercassette™)	Amersham Pharmacia
Saran-Folie	Roth
Schütteltisch/Schwenkinkubator	Heidolph
Schüttler	Eppendorff
Skalpelle Stärke 10	Lager
Sterilbank (Lamin Air, HBB2448)	Heraeus
Thermoblock	Eppendorff
Tiefkühlschränke	Liebherr, Heraeus
Tischzentrifugen	Eppendorff
UV-Lampe (Biometra TI3)	Biometra
Vortexer VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad (julabo 5B)	Julabo
Zellkulturpipetten	Brand, TPP
Zellkulturschalen/Petrischalen (100x20mm)	TPP
Zellschaber	Biochrom

2.4 Pufferansetzungen

Puffer	Herstellungsanweisung
Lysispuffer	10mM Tris, pH 7.5 140mM NaCl 1mM EDTA 25% Glycerol 0.5% SDS 0.5% Nonident P-40 dann auf 1ml folgendes hinzugeben: 0.1mM DTT, 0.5mM PMSF, 100 ng/ml Proteaseinhibitor Cocktail (PIC)
12.5% SDS-Trenngel	4.0ml 30% Acrylamid-Mix; 2.5ml 1.5M Tris Base pH 8.8 3.3ml Millipore- H ₂ O 100µl 10% SDS 100µl 10% APS 4µl TEMED
5% Sammelgel	1.3ml 30% Acrylamid Mix 1ml 1M Tris-HCl pH 6.8 5.5ml Millipore- H ₂ O 80µl 10% SDS 80µl 10% APS 8µl TEMED
Elektrophoresepuffer 5x	15.1g Tris Base pH 8.8 94.0g Glycin 50ml 10% SDS mit Millipore- H ₂ O auf 1 Liter auffüllen, auf pH 8.3 einstellen
Transferpuffer 4x	14.415 g Glycin 3.03 g Tris Base pH 8.8 mit Millipore- H ₂ O auf 800 ml auffüllen, auf pH 8.3 einstellen → 4 Teile gebrauchsfertigen Puffer plus 1 Teil Methanol
TBS-T 5x	12.1 g Tris Base 40 g NaCl mit Millipore- H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, auf pH 7.6 einstellen → gebrauchsfertigen Puffer mit 0.1% TWEEN 20 versetzen.
Collagenase-Dispase-Puffer	DNase 20mg NaCl 16g KCl 0.74g Na ₂ HPO ₄ 0.2g Hepes 12g Glucose 4g Wasser ad 2l pH 7.3, sterilfiltrieren und 5g BSA zugeben Collagenase 2mg/ml, Dispase 2mg/ml Vor jeder Aufarbeitung ein Falcon Röhrchen bei RT auftauen lassen und frisch mit 120µl 2.5% Trypsin und 188µl 0.1M CaCl ₂ versetzen.

2.5 Strategie der Probenverwendung

2.5.1 Gefrorene Myokardproben

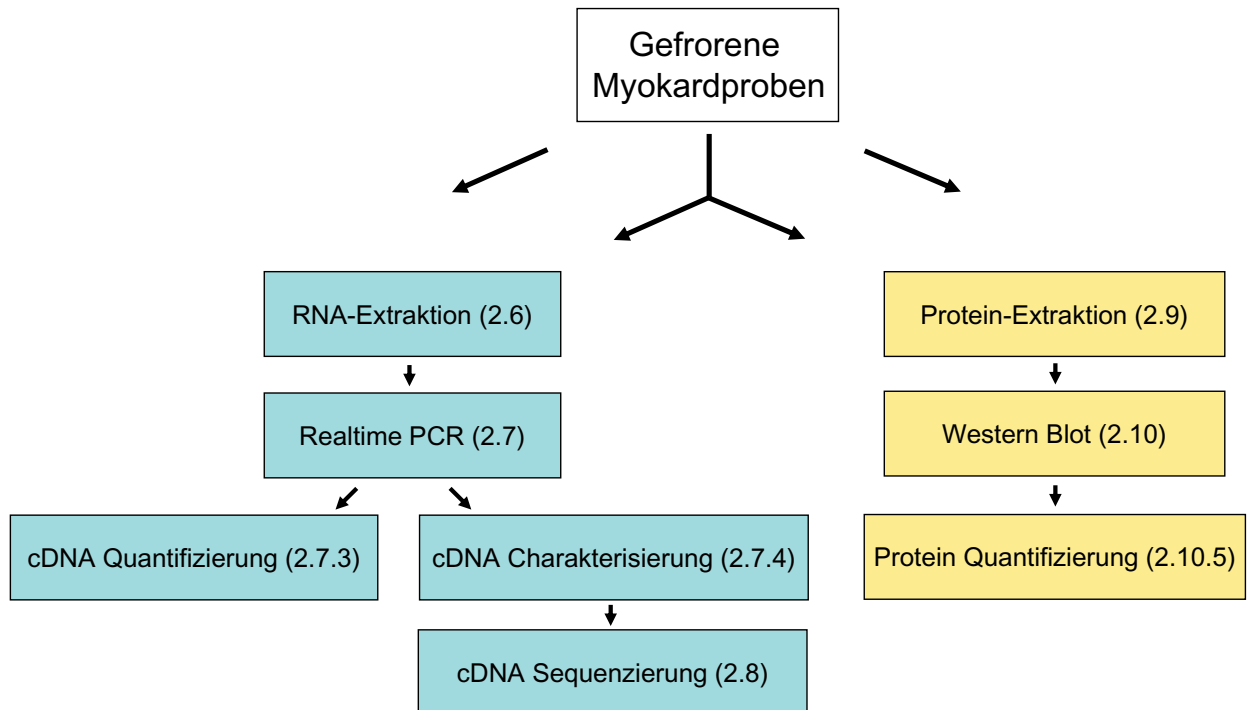


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der weiteren Strategie für die Verwendung der gefrorenen Myokardproben. Alle verwendeten Verfahren sind im folgenden Methoden-Teil ausführlich dargestellt.

2.5.2 Frische Myokardproben

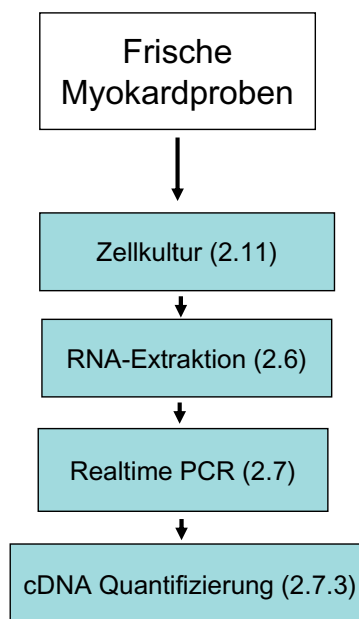


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der weiteren Strategie für die Verwendung der frischen Myokardproben. Alle verwendeten Verfahren sind im folgenden Methoden-Teil ausführlich dargestellt.

2.6 RNA-Extraktion und Herstellung von cDNA

Um Kontaminationen mit cDNA- oder DNA-Fragmenten zu verhindern, wurden alle Vorgänge der RNA-Extraktion in eigens dafür eingerichteten Räumlichkeiten durchgeführt. Alle Vorgänge fanden unter Probenkühlung statt. Die RNA-Extraktion basierte auf der Guanidinium-Thiozyanat-Phenol-Chloroform Methode nach Sacchi und Chomczynski⁵¹.

2.6.1 RNA-Extraktion aus myokardialen Gewebeproben

2.6.1.1 Homogenisierung der myokardialen Gewebeproben

Die gefrorenen Myokardproben wurden in einem FastPrep™-Gerät homogenisiert. Dazu wurde jede Myokardprobe in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt, welches mit Keramik-Kügelchen (LysisMatrix Typ A™) gefüllt war, und anschließend mit 600µl RNAZOL™B versetzt. In einem nächsten Schritt wurden die Keramik-Kügelchen in dem FastPrep™-Gerät so stark beschleunigt, dass die Myokardproben zermörsert wurden. Dieser Vorgang wurde einmalig für 30sec ausgeführt und diente dem mechanischen Zellaufschluss. Die Reaktionsansätze wurden dann mit 400µl RNAZOL™B aufgefüllt und bei 4°C für 30min zum weiteren chemischen Zellaufschluss auf einem Schüttler durchmischt.

Ein Teil der Myokardproben wurde durch die Arbeitsgruppe Dr. Reinhard Pregla (DHZB) aufgearbeitet und als RNA zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung gestellt.

2.6.1.2 RNA-Präzipitation

Die Proben wurden mit je 200µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (im Verhältnis von 1:24) versetzt, für 2min durchmischt und dann für 10min bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert. Dies führte zu einer Trennung des Ansatzes in eine obere klar wässrige RNA-haltige Phase und in eine untere blaue phenolhaltige Phase mit organischen Bestandteilen und DNA. 500µl des klar wässrigen Überstandes wurden in ein neues 1.5ml Eppendorff-Gefäß überführt, das zuvor mit 500µl Isopropanol befüllt wurde, und die RNA für 12h bei -20°C präzipitiert. Danach wurde die RNA über 30min bei 4°C und 14.000rpm in der Kühlzentrifuge pelletiert und anschließend zweimal mit 1ml 80%-igem Ethanol gewaschen. Das ethanolgewaschene RNA-Pellet wurde nachfolgend luftgetrocknet und resuspendiert.

Dieser Schritt wurde sowohl bei der RNA-Extraktion als auch nach dem DNase-I-Verdau (2.6.4) durchgeführt. Die Resuspension wurde mit 35µl DEPC-Wasser bei der RNA-Extraktion und mit 30µl DEPC-Wasser nach DNase-I-Verdau vorgenommen.

2.6.2 RNA-Extraktion aus menschlichen kardialen Fibroblasten

Nach Beendigung der Stimulationsversuche (2.11.3) wurden die Zellkulturschalen auf Eis gelagert, vom Zellkulturmedium befreit und zweimal mit PBS-Lösung gewaschen. Danach wurde auf jede Schale 1ml RNAZOL™B gegeben und mit Schabern verteilt. Dadurch wurden die Fibroblasten von der Zellkulturschale abgelöst und die Zellen chemisch aufgeschlossen. Dieses Material wurde zusammenschabt, in einer 1ml Pipette aufgesogen und in ein 1.5ml Eppendorff-Gefäß überführt. Die weitere Präzipitation der RNA entsprach dem Vorgehen wie in 2.6.1.2 beschrieben.

2.6.3 Vermessung des Nukleotidgehaltes

Der Nukleotidgehalt der RNA-Lösungen wurde photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt. Dazu wurden in einer 1:20-Verdünnung 5 μl der RNA-Lösung und 95 μl DEPC behandeltes Wasser gemischt und in eine Quarzküvette pipettiert. Anschließend wurde die OD gemessen. Die Lagerung der RNA-Lösungen erfolgte bei -80°C im Tiefkühlschrank.

2.6.4 DNase-I-Verdau

Nach Extraktion der RNA (2.6.1 und 2.6.2) wurden die Proben einem sog. DNase-I-Verdau unterzogen, um DNA-Bestandteile zu entfernen. Pro Mikrogramm RNA wurden eine Einheit DNase, 1mM Mangan(II)-Chlorid (MnCl_2) als Co-Faktor und 40 Einheiten RNase-Inhibitor eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C in einem Thermoblock und wurde nach 10min durch Zugabe von 1ml RNAZOL™B gestoppt. Anschließend wurde die RNA, wie bereits in 2.6.1 beschrieben, erneut extrahiert und der RNA-Gehalt photometrisch vermessen. Die DNase-I-behandelten RNA-Lösungen wurden einheitlich auf die Konzentration 125ng/ μl verdünnt, aliquotiert und bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert.

2.6.5 Reverse Transkription (RT)

Zur Herstellung von cDNA wurde eine „Reverse Transkription“ (RT) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 500ng RNA zusammen mit 600ng Random-Hexamer-Primern in ein 1.5ml Eppendorff-Gefäß gegeben, für 10min bei 70°C in einem Thermoblock inkubiert und anschließend auf einem Eisblock gekühlt. Die weiteren Reagenzien wurden zu einem Mastermix vereint (Tab. 2.5), von dem jeweils 9 μl zu jedem Reaktionsansatz gegeben wurden. Die Ansätze wurden durchmischt und kurz zentrifugiert. Es folgte eine 10min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend eine 50min Inkubation bei 42°C in einem Thermoblock. Die RT-Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes für 5min bei 95°C beendet. Abschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt, auf eine Endkonzentration von 10ng/ μl eingestellt, aliquotiert und bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

Tab. 2.5 Verwendeter Mastermix für die Reverse Transkription (RT)

Bestandteil	Volumen / Reaktionsansatz
5 x RT-Puffer (250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl ₂ , pH 8.3)	4µl
DTT (100mM)	2µl
RNAsin (40U/µl)	1µl
dNTP-Mix (2.5mM)	1µl
Superscript® (200U/µl)	1µl

Siehe Chemikalienliste (Kapitel 2.2). DTT: Dithiothreitol, RNAsin: RNase-Inhibitor.
 Übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.7.1 Angewendetes Verfahren der „realtime RT-PCR“

Zur Quantifizierung und Charakterisierung von mRNA wurde die zugehörige cDNA mit „realtime RT-PCR“ an einem LightCycler™ untersucht. Das hier verwendete Verfahren wurde in drei Schritten (Denaturierung, Primer-Anlagerung und Strang-Verlängerung) durchgeführt und entsprach damit dem Ablauf einer klassischen PCR⁵². Hervorzuhebendes Kennzeichen der „realtime PCR“ ist, dass die Amplifikate bereits während der PCR mit Fluoreszenzfarbstoff-Trägern interagieren und deshalb in Echtzeit quantifiziert (2.7.3) und anschließend charakterisiert (2.7.4) werden können. In der vorliegenden Arbeit dienten als Fluoreszenzfarbstoff-Träger entweder ein spezifisches Paar Hybridisierungssonden (2.7.3.1) oder der interkalierende Farbstoff SYBR Green I (2.7.3.2).

2.7.2 Primer für RT-PCR / Temperatur- und Zyklusprofile

Für die RT-PCR wurden jeweils spezifische Primerpaare und gegebenenfalls auch dazugehörige Hybridisierungssonden erstellt. Die entsprechenden Oligonukleotide wurden mit den Software-Programmen „Primer-Express“ und „Dnasis 2.1.“ oder von der Firma TibMolbiol entworfen (Tab. 2.7) und anschließend von den Firmen Biotex und TibMolbiol hergestellt. In Tab. 2.6 sind die verwendeten Temperatur- und Zeitprofile für die jeweiligen RT-PCRs dargestellt.

Tab. 2.6 Verwendete Temperatur- und Zeitprofile der entsprechenden realtime RT-PCR

RT-PCR	MgCl ₂	Denaturierung	Zyklusprofil	Extension
ERalpha	5mM	10' 95°C	45 Zyklen: 10'' 95°C, 25'' 62°C, 30'' 72°C	5' 72°C
ERbeta	4mM	10' 95°C	45 Zyklen: 10'' 95°C, 12'' 63°C, 30'' 72°C	5' 72°C
GAPDH	2mM	10' 95°C	40 Zyklen: 10'' 95°C, 6'' 60°C, 10'' 72°C	5' 72°C
ET-1	2mM	10' 95°C	40 Zyklen: 10'' 95°C, 6'' 56°C, 10'' 72°C	5' 72°C
ET(A)-R	4mM	10' 95°C	40 Zyklen: 10'' 95°C, 6'' 60°C, 13'' 72°C	5' 72°C

' : Minuten, '' : Sekunden. Übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

Tab. 2.7 Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen mit zugehörigen Basenpaarlängen

Identifikation	Oligonukleotid-Sequenzen	Länge
ERalpha F-Primer	5'-GGA ATG ATG AAA GGT GGG ATA -3'	257 bp
ERalpha R-Primer	5'-TCT GGT AGG ATC ATA CTC GGA -3'	
ERalpha Donor-Sonde	5'-CGA CCA GAT GGT CAG TGC CTT GT – FAM	
ERalpha Akzeptor-Sonde	5'-LCRed640 – GGA TGC TGA GCC CCC GAT ACT CTA p	
ERbeta F-Primer	5'-AAG ATC GCT AGA ACA CAC CTT A -3'	182 bp
ERbeta R-Primer	5'-GCC TTA CAT CCT TCA CAC GA -3'	
ERbeta Donor-Sonde	5'-CAG CCC TGT TAC TGG TCC AGG TTC – FAM	
ERbeta Akzeptor-Sonde	5'-LCRed640 – AAG AGG GAT GCT CAC TTC TGC GC p	
GAPDH F-Primer	5'-CAC CAT CTT CCA GGA GCG AG-3'	210 bp
GAPDH R-Primer	5'-GCA GGA GGC ATT GCT GAT-3'.	
ET-1 F-Primer	5'-TCT ACT TCT GCC ACC TGG-3'	130 bp
ET-1 R-Primer	5'-TTC ACG GTC TGT TGC CTT-3'	
ET _A -Rezeptor F-Primer	5'-ACC TGT ATG CTC AAT GCC AC-3'	310 bp
ET _A -Rezeptor R-Primer	5'-CAT CGG TTC TTG TCC ATC TC-3'	

Donor-Sonde: Hybridisierungssonde markiert mit dem Donor-Fluorophor FAM (6-Carboxy-Fluoreszein), Akzeptor-Sonde: Hybridisierungssonde markiert mit dem Akzeptor-Fluorophor LCRed 640 (LightCyclerRed 640). Übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

2.7.3 Quantifizierung von cDNA

2.7.3.1 Hybridisierungssonden-Methode

Bei diesem Verfahren wurden zwei sequenzspezifische Oligonukleotide, die Fluoreszenzfarbstoffe trugen, als Hybridisierungssonden verwendet. Banden diese beiden Sonden während der Anlagerungs-Phase der RT-PCR in einer Entfernung von 1-5 Basenpaaren an die Zielsequenz, so fand zwischen dem 5' Donor-Fluorophor und dem 3' Akzeptor-Fluorophor ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. Als Donor-Fluorophor wurde 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) und als Akzeptor-Fluorophor LightCycler Red 640 (LCRed 640) verwendet. Die empfangene Signalfuoreszenz wurde auf dem Kanal „F2“ ($\lambda=640\text{nm}$) des LightCyclers™ aufgezeichnet und war proportional zur Menge der vorliegenden cDNA-Zielsequenz. Zum Abschluss der RT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die eine Charakterisierung der cDNA-Zielsequenz ermöglichte (2.7.4).

Für das Verfahren mit Hybridisierungssonden wurden pro Ansatz in 17.5 μl eines Mastermixes (Tab. 2.8) jeweils 2.5 μl (25ng) der zu amplifizierenden cDNA pipettiert. Für jede zu messende Probe wurde bei diesem Verfahren ein Doppelansatz pipettiert. Alle Reaktionsansätze wurden in eine auf 4°C vorgekühlte Glaskapillare pipettiert, in einer Kühlzentrifuge bei 3.000rpm für 5sec herunterzentrifugiert und dann im Rotor des Light-Cyclers™ positioniert.

Tab. 2.8 Verwendeter Mastermix für jeweilige Hybridisierungssonden – RT-PCR

Bestandteile	Volumen / Kapillare ERalpha – PCR	Volumen / Kapillare ERbeta – PCR
Vorwärts-Primer (5µM)	1µl	0.5µl
Rückwärts-Primer (5µM)	1µl	1µl
Donor-Sonde FAM (2µM]	1µl	1µl
Akzeptor-Sonde LCRed 640 (2µM]	1µl	1µl
FastStart DNA Master Hybridization Probes®	2µl	2µl
MgCl ₂ (25mM)	3µl	2.4µl
Steriles H ₂ O	8µl	9.6µl

Donor-Sonde: Hybridisierungssonde markiert mit dem Donor-Fluorophor FAM (6-Carboxy-Fluoreszein), Akzeptor-Sonde: Hybridisierungssonde markiert mit dem Akzeptor-Fluorophor LCRed 640 (LightCyclerRed 640), FastStart DNA Master Hybridization Probes®: Reaktionsmix mit Taq DNA-Polymerase. Übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

2.7.3.2 SYBR Green I Methode

Der Farbstoff SYBR Green I interkalierte unspezifisch in doppelsträngige cDNA-Fragmente. Dieser Vorgang führte zur drastischen Erhöhung der Intensität seines grünen Fluoreszenzsignales, welches kontinuierlich auf dem Kanal „F1“ ($\lambda=515\text{nm}$) des Light-Cyclers™ aufgenommen wurde. Das empfangene Fluoreszenzsignal korrespondierte dabei zur vorliegenden Menge an doppelsträngiger cDNA. Die Spezifität des Fluoreszenzsignals wurde zum Abschluss der RT-PCR in einer Schmelzkurvenanalyse (2.7.4.1) überprüft.

Im SYBR Green I-Verfahren wurden pro Ansatz 17.5 µl eines Mastermixes (Tab. 2.9) und jeweils 2.5µl der zu amplifizierenden cDNA durchmischt. Alle Reaktionsansätze wurden in eine auf 4°C vorgekühlte Glaskapillare pipettiert, in einer Kühlzentrifuge bei 3.000rpm für 5sec herunterzentrifugiert und dann im Rotor des LightCyclers™ positioniert.

Tab. 2.9 Verwendeter Mastermix für SYBR Green I – RT-PCR

Bestandteile	Volumen / Kapillare
Vorwärts-Primer (5µM)	1µl
Rückwärts-Primer (5µM)	1µl
FastStart DNA Master SYBR Green I®	2µl
MgCl ₂ (25mM)	0.8µl
Steriles H ₂ O	12.7µl

Siehe Chemikalienliste (Kapitel 2.2). FastStart DNA Master SYBR Green I®: Reaktionsmix mit Taq DNA-Polymerase. Übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 9).

2.7.3.3 Kontrollreaktionen

Zur Kontrolle auf DNA/cDNA-Kontamination der RT- und PCR-Chemikalien wurde jeweils eine Probe mit einem RNA-freien RT-Ansatz, sowie eine Wasser-Probe als Ausgangsmaterial mitgeführt und in einer GAPDH-PCR (Tab. 2.6 und 2.7) überprüft.

2.7.3.4 Auswertung durch den LightCycler™

Die Auswertung fand automatisch durch den LightCycler™ statt. Dazu wurde zunächst für jede Kapillare die Steigungsänderung des Fluoreszenzsignals parallel zur RT-PCR ermittelt. Am Punkt der maximalen Steigungsänderung wurde dann der sog. Ct-Wert angegeben („Second Derivative Maximum Method“), der als Ausgangswert für die Quantifizierung der cDNA mithilfe des Standardkurvenprinzips benötigt wurde.

In jedem RT-PCR-Ansatz wurden Proben in einer Standardkurve mitgeführt, die aus einem cDNA-Gemisch der zu messenden Proben bestanden. Eine Standardkurve wurde dazu benötigt, um eine relative cDNA-Quantifizierung der Einzelproben zu ermöglichen. Dazu wurden verschiedene cDNA-Mengen in einer Verdünnungsreihe eingesetzt, z.B. 50ng, 25ng, 12.5ng, 6.25ng, 3.125ng und 1.5625ng. Nach jedem RT-PCR-Lauf wurde automatisch im LightCycler™ eine Ausgleichsgerade (lineare Regression) der Standardkurve erstellt und halblogarithmisch dargestellt. Die Verdünnungsstufen wurden dabei auf der x-Achse logarithmisch und der zugehörige Ct-Wert auf der y-Achse linear aufgetragen (Abb. 2.3). Diese halblogarithmische Darstellung resultierte in einer „Geraden“, wobei der Parameter „Slope“ die Steigung und der Parameter „Intercept“ den y-Achsen-Schnittpunkt darstellte. Dann wurden die Ct-Werte aller Kapillaren mit dieser „Geraden“ verglichen, die relativen cDNA-Mengen berechnet und die zugehörigen Werte ausgegeben.

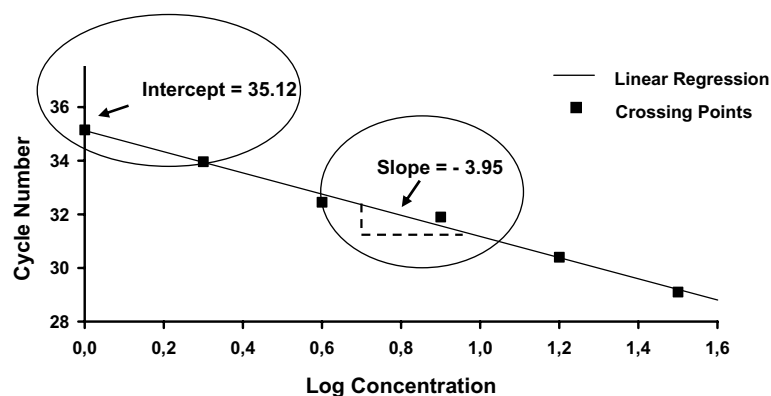


Abb. 2.3 Schematische Darstellung einer Standardkurve. Log Concentration: logarithmisch aufgetragene Verdünnungsstufen, Cycle Number: Punkt der maximalen Steigungsänderung des Fluoreszenzsignals korrespondierend zu „Crossing Points“ (Ct), Intercept: y-Achsen-Schnittpunkt, Linear Regression: entstandene Ausgleichsgerade, Slope: Steigung der Ausgleichsgeraden.

2.7.3.5 Bezug auf das Referenzgen GAPDH / Korrelation zu anderen Genen

Um Varianzen in der RNA-Aufarbeitung und RT auszugleichen, wurden die Werte der untersuchten Zielgene durch den zugehörigen Wert des Referenzgens GAPDH dividiert. Der daraus gebildete Quotient gab Auskunft über die relative Expression des Zielgens in der jeweiligen Probe.

Für Korrelations-Untersuchungen zwischen ER und bekannten Hypertrophie- und Herzinsuffizienz-assoziierten Genen wurden aus einer überlappenden Patientengruppe Werte für BNP, Calcineurin A beta (CnA beta) und Calcineurin B (CnB) verwendet, die in zwei anderen Dissertations-Projekten (Ulrike Gemke und Jan Bass) erarbeitet wurden.

2.7.4 Charakterisierung der RT-PCR-Amplifikate

2.7.4.1 Schmelzkurve zum Nachweis der RT-PCR-Spezifität

Unmittelbar nach der RT-PCR wurden die Reaktionsansätze für 5min bei 95°C hitzedenaturiert und dann auf eine Basistemperatur von 60°C heruntergekühlt, wodurch die Doppelstränge wieder renaturieren konnten. Anschließend wurden diese Ansätze mit einer konstanten Aufheizrate von 0.5°C/sec auf 95°C erhitzt. Währenddessen wurde in jedem Ansatz das ausgesendete Fluoreszenzsignal kontinuierlich aufgezeichnet. Durch die steigende Temperatur (δT) dissoziierten immer mehr Doppelstränge im Ansatz, weshalb die Intensität der Fluoreszenz stetig abnahm (δF) (Abb. 2.4A). Das interne Auswertungsprogramm des Light-Cyclers™ bildete die erste negative Ableitung des Fluoreszenzsignals nach der Temperatur ($-\delta F/\delta T$). So ergab sich für jedes Amplifikat ein spezifischer Schmelzgipfel (Abb. 2.4B), anhand dessen die RT-PCR-Produkte identifiziert werden konnten.

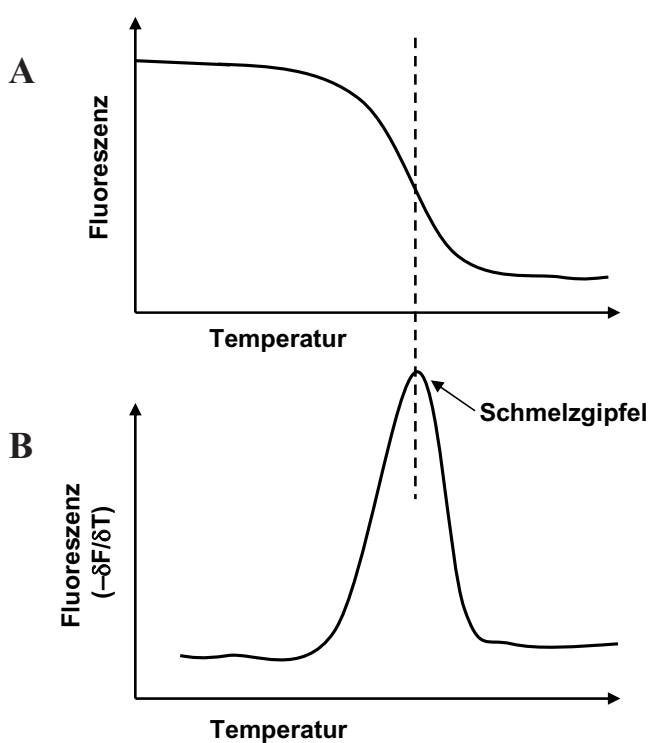


Abb. 2.4

Schematische Darstellung einer Schmelzkurve. A: Die Intensität der Fluoreszenz nimmt mit zunehmender Temperatur stetig ab, B: Die Änderung der Intensität des Fluoreszenzsignals ist am „Schmelzgipfel“ maximal.

2.7.4.2 Charakterisierung eines single-nucleotide-polymorphism (SNP)

Die Schmelzkurve (2.7.4.1) nach realtime RT-PCR mit Hybridisierungs sonden (2.7.3.1) erlaubte die Charakterisierung eines SNPs in der ERalpha cDNA. Dabei fasste die FAM-Sonde den nicht-polymorphen Bereich des Nukleotidabschnitts. Die LCRed 640-Sonde fasste wiederum die polymorphe Stelle im Nukleotidabschnitt und wurde als „Detektions-Sonde“ verwendet. Je nach vorliegender Zielsequenz löste sich die „Detektions-Sonde“ in den Proben mit Wildtyp (WT) und in den Proben mit SNP bei unterschiedlichen Temperaturen (T_m) vom Zielstrang, woraufhin verschiedene Schmelzgipfel-Muster (Abb. 2.4) entstanden. Für homozygote WT- und SNP-Proben ergab sich ein eingipfliges Muster, wobei sich deren Schmelzgipfel- T_m unterschieden. Bei den heterozygoten Proben entstand hingegen ein doppelgipfliges Muster, in welchem sowohl der WT-Schmelzgipfel als auch der SNP-Schmelzgipfel zu sehen waren. Diese Befunde wurden dann mithilfe einer Sequenzierungs-Analyse (2.8) weiter überprüft.

2.8 Sequenzierungs-Analyse

Die Schmelzkurvenanalyse der ERalpha-PCR mit Hybridisierungs sonden zeigte drei verschiedene Muster bei der cDNA aus myokardialen Gewebeproben. Deshalb wurde eine stichprobenartige Sequenzierungs-Analyse dieser PCR-Amplifikate durchgeführt, um die vorliegende Nukleotidsequenz zu identifizieren. Dazu wurde das Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet.

2.8.1 Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger

Bei dieser Methode mussten die PCR-Amplifikate zunächst von den übrigen Chemikalien und Oligonukleotiden befreit werden (2.8.2). Anschließend wurden die aufgereinigten Amplifikate einer Sequenzierungs-PCR (2.8.3) unterzogen. Dabei wurden neben desoxy-Nukleosid-Tri-Phosphaten (dNTPs) auch didesoxy-Nukleosid-Tri-Phosphate (ddNTPs) verwendet, die zu einem Abbruch der Kettenreaktion an zufälliger Position führten. Durch spezifische Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs konnte dann im Sequenzier-Gerät, nach erneuter Aufreinigung (2.8.4), jede Position auf der detektierten Sequenz einer spezifischen Base zugeordnet werden.

2.8.2 Aufreinigen der PCR-Produkte

Die PCR-Amplifikate wurden über Microcon-Säulen aufgereinigt. Dadurch sollten alle anderen Bestandteile des PCR-Ansatzes wie z.B. Ionen, nicht eingebaute dNTPs und Enzyme entfernt werden. Dazu wurden 480µl deionisiertes Wasser und das gesamte Volumen an PCR-Amplifikaten (20µl) auf jede Säule gegeben. Die so beladenen Säulen wurden für 15min bei 3000rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde das Zentrifugat verworfen. Nun wurden die Säulen umgedreht, mit 20µl deionisiertem Wasser beladen und für 5min bei 3000rpm zentrifugiert. So wurde pro Probe etwa 15-20µl an aufgereinigtem PCR-Amplifikat gewonnen. Davon wurde jeweils 2µl Probe auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Dieses Gel wurde zuvor in zwei Schritten gefertigt. Zunächst wurde ein Agarose-TBE-Gemisch zum Kochen gebracht. Nach kurzer Abkühlung wurde diesem Gemisch etwa 2µl Ethidiumbromid zugesetzt. Somit konnten die Proben unter UV-Licht visualisiert werden. Anhand der Bandenstärke wurde die aufgetragene Amplifikatmenge abgeschätzt. Für die Sequenzierungs-PCR (2.8.3) wurden dann pro Probe etwa 3-10ng aufgereinigtes Amplifikat verwendet.

2.8.3 Sequenzierungs-PCR

In ein Reaktionsgefäß wurden 3µl BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, bestehend aus dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dUTP), Amplitaq DNA Polymerase, MgCl₂, Tris-HCl Puffer pH 9.0 und fluoreszenzmarkierten ddNTPs (ddATP-dichloro[R6G], ddCTP-dichloro[ROX], ddGTP-dichloro[R110], ddTTP[TAMRA]) gegeben. Dazu wurden 3.2pmol (ca. 3µl) der zugehörigen Primer pipettiert, welche bereits in der Ausgangs-PCR verwendet wurden (Tab. 2.6). Dieser Ansatz wurde mit dem entsprechende Probenvolumen für etwa 3-10ng pro Probe und deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 10µl aufgefüllt. Anschließend wurde eine Sequenzierungs-PCR an einem GeneAmp 9600 in 25 Zyklen mit folgendem Thermo- und Zeitprofil durchgeführt: 10sec bei 96°C, 5sec bei 50°C und 4min bei 60°C. Nach Abschluss der Sequenzierungs-PCR wurde das Gerät auf 4°C heruntergekühlt. Dort verblieben die Proben bis zum nächsten Aufreinigungsschritt (2.8.4).

2.8.4 Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte und Analyse

In diesem Schritt wurden die Produkte der Sequenzierungs-PCR von den freien, fluoreszenzmarkierten ddNTPs befreit, welche die Auswertung durch das Sequenziergerät stören würden.

Zunächst wurde eine Sephadex-Säule hergestellt. Dazu wurde eine Grundmatrix aus 2.4g Sepharose und 28ml Wasser erstellt, von der 600µl auf jede Sephadex-Säule gegeben wurden. Die Säulen wurden bei 3000rpm für 2min trocken zentrifugiert und konnten anschließend verwendet werden. Die Produkte der Sequenzierungs-PCR (10µl) wurden zusammen mit 10µl deionisiertem Wasser auf die Säule gegeben und bei 3000rpm für 5min zentrifugiert. Das entstandene Zentrifugat (20µl) wurde in einem Kapillarsequenzer ABI 370 analysiert.

2.9 Protein-Extraktion

Der durchgeführte Homogenisierungsprozess ähnelte dem zur RNA-Extraktion aus den myokardialen Gewebeproben (2.6.1). Alle Vorgänge fanden unter Probenkühlung statt.

2.9.1 Protein-Extraktion aus myokardialen Gewebeproben

Jede Myokardprobe wurde in gefrorenem Zustand in einem autoklavierten 1.5ml Eppendorff-Gefäß auf einer Feinwaage gewogen. Dann wurden die gefrorenen Myokardproben in ein mit Keramik-Kügelchen (LysisMatrix™ Typ D) gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Dort hinein wurde die fünffache Probenmenge an Lysispuffer gegeben und die Reaktionsgefäße in einem FastPrep™-Gerät positioniert. Die Myokardproben wurden darin durch Kollision mit den Keramik-Kügelchen zermörsert. Dieser Vorgang wurde zweimal für 20sec wiederholt und führte zum mechanischen Zellaufschluss. Zwischen den beiden Homogenisierungen wurden die Proben auf Eis gelagert. Danach wurde zu den Ansätzen 0.05mM SDS-Lösung pipettiert und die Ansätze für 20min zum chemischen Zellaufschluss erneut auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben für 10min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der wässrige proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und in ein gekühltes 1.5ml Eppendorff-Gefäß überführt. Jeweils 20µl einer Probe wurden für die Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration in ein Extra-Gefäß gefüllt und bei -80°C gelagert.

2.9.2 Vermessung der extrahierten Gesamtprotein-Konzentration

Die Vermessung der extrahierten Gesamtprotein-Konzentration jeder Probe erfolgte mit einem Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay auf einer Mikrotiterplatte im 96-Kanal ELISA-Reader.

2.9.2.1 Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay

Jede Probe wurde in vier verschiedenen Verdünnungsstufen in die Einbuchtungen der Mikrotiterplatte pipettiert: 2µl und 5µl einer 1:10 Verdünnung sowie 2µl und 5µl der unverdünnten Probe. Jede Verdünnungsstufe wurde im Doppelansatz pipettiert und auf ein Endvolumen von 20µl mit Millipore-Wasser aufgefüllt. Um das unspezifische Hintergrundsignal des Lysispuffers abzuschätzen, wurde dieser in gleicher Weise auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Weiterhin wurden jeweils 20µl einer Verdünnungsreihe eines Albuminstandards (2000µg/ml, 1000µg/ml, 500µg/ml, 400µg/ml, 300µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml) in Doppelansätzen aufgetragen. Nun wurden in jede Einbuchtung noch 300µl des BCA Protein Assay-Reagenzgemisches mit einer Multipipette hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 30min Inkubation der Mikrotiterplatte bei 37°C im Hybridisierungsofen, die zu einem Farbstoffumschlag führte. Dieser kam durch die Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen zustande, welche dann mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bildeten, und war proportional zur vorliegenden Gesamtprotein-Konzentration.

2.9.2.2 Vermessung des Gesamtprotein-Konzentration im ELISA-Reader

Die Mikrotiterplatte wurde in den 96-Kanal ELISA-Reader gestellt und die Farb-Extinktionswerte bei 562nm gemessen. Durch das Gerät wurde eine Ausgleichsgeraden-Funktion der Albumin-Verdünnungsreihe erstellt, anhand derer die Gesamtprotein-Konzentration für jede Einbuchtung in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben werden konnte. Für jede einzelne Probe erfolgte dann die Berechnung der Gesamtprotein-Konzentration in einem Dreischritt-Verfahren. Im ersten Schritt wurde in jeder Verdünnungsstufe der Mittelwert der Doppelansätze gebildet. Dann wurden diese Mittelwerte mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Schließlich wurden im dritten Schritt die vier resultierenden Werte gemittelt und der unspezifische Hintergrundwert des Lysispuffers subtrahiert. Die Proben wurden auf eine einheitliche Protein-Konzentration von $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt, aliquotiert und bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert.

2.10 Western-Blot-Verfahren

2.10.1 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

2.10.1.1 Herstellung eines SDS-Elektrophoresegels

Das SDS-Elektrophoresegel setzte sich aus zwei Anteilen zusammen. Im oberen Anteil befand sich das weitporige Sammelgel, in welchem die Proben zu einer schmalen Bande konzentriert wurden. Im unteren Anteil befand sich das engporige Trenngel, in welchem die Auftrennung des Proteingemisches nach Molekulargewicht erfolgte.

Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei abgedichtete Glasplatten in einer Gelvorrichtung gegossen und mit einer Wasserschicht bedeckt. Nach etwa 60min war das Trenngel vollständig auspolymerisiert und das Wasser konnte abgegossen werden. Über das 12.5%ige Trenngel wurde nun das 5%ige Sammelgel gegossen und dort sofort ein 24-zähliger Kamm hineingesteckt, um Pipettier-Taschen zu erzeugen. Der gesamte Gelapparat wurde dann mit Saran-Folie abgedeckt, um eine mögliche Austrocknung des Gels zu verhindern. Anschließend wurde der Gelapparat über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurde das SDS-Elektrophoresegel in eine Elektrophoresekammer überführt, die mit 2.5l gekühltem Elektrophoresepuffer gefüllt war.

2.10.1.2 Beladung des SDS-Elektrophoresegels / SDS-PAGE

Jeweils 11µl Probe (ca. 10µg Protein) wurden mit 3µl eines bromphenolblauhaltigen Puffers (Rotiload 2) versetzt und für 5min bei 95°C im Thermoblock denaturiert. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur, wurden die Pippetier-Taschen des SDS-Elektrophoresegels mit den Proben beladen. In die erste Tasche wurde 5µl eines Molekulargewichts-Markers (Rotimark) pipettiert, um einen Größenvergleich der aufgetrennten Proteine innerhalb des Gels durchführen zu können. In die Taschen 2-21 wurden dann jeweils 14µl der Proben pipettiert. Die Taschen 22-24 wurden mit jeweils 14µl eines Gemisches aller Proben beladen, um bei der späteren Auswertung (2.10.6) mögliche Unterschiede im Elektro-Blot (2.10.2) ausgleichen zu können. An die Elektrophoresekammer wurde 30min lang 80V und anschließend 90min lang 100V Spannung bei einer Stromstärke von 350mA angelegt, bis der bromphenolblauhaltige Ladepuffer sichtbar das Trenngel verlassen hatte.

2.10.2 Elektro-Blot

Die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden anschließend mithilfe eines Elektro-Blots auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde ein „Sandwich“ in einem Kunststoffgitter hergestellt. In Serie wurden ein Schaumstoff-Schwämmchen, Filterkartonpapier, beladenes Trenngel, zugeschnittene Nitrocellulosemembran, Filterkartonpapier und ein Schaumstoff-Schwämmchen übereinandergelegt und in das Kunststoffgitter eingespannt. Alle Bestandteile wurden zuvor mit Transferpuffer-Lösung äquilibriert. Nach dem Einspannen wurde das Kunststoffgitter mehrmals glattgestrichen, um mögliche Luftblasen zwischen den Schichten zu entfernen. Dann wurde das beladene Kunststoffgitter in die Elektro-Blot-Kammer eingelegt und mit 5l Transferpuffer umspült. Der Elektro-Blot erfolgte bei 60V Spannung und 350mA für 90min unter ständiger Kühlung der Apparatur durch eine wasserbetriebene Kühlanlage.

2.10.3 Anfärbung der Nitrocellulose-Membranen mit Ponceau S-Lösung

Nach Beendigung des Elektro-Blots wurden die Nitrocellulose-Membranen für 1min mit Ponceau S-Lösung (0.1% v/w in 5% Eisessig) auf dem Schüttler rot angefärbt und je zweimal für 5min mit Aqua-dest gewaschen. Die Proteinbanden der Proben blieben nach dem Waschen rot angefärbt. Die Banden des Molekulargewichtsmarkers blieben ebenfalls sichtbar und wurden zur Fixierung mit einem Kugelschreiber nachgezogen. Nach Trocknung auf Filterpapier wurden die Membranen auf einer Höhe des Molekulargewichtsmarkers geschnitten, die zwischen den zu erwartenden Höhen von ERalpha (66kD) und GAPDH (36kD) lag. Dies geschah, um den gleichen Elektro-Blot für die Detektion zweier unterschiedlicher Proteine, dem Zielprotein ERalpha und dem Referenzprotein GAPDH, verwenden zu können. Die Membranen wurden bis zur Antikörperhybridisierung (2.10.4) bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.10.4 Antikörperhybridisierung

Die Nitrocellulosemembranen wurden zunächst für 60min mit 5%igem Blocking-Reagenz versetzt. Damit sollte die gesamte Membran gleichmäßig mit Proteinen gesättigt und die unspezifische Bindung der Antikörper minimiert werden. Danach wurden die Membranen mit dem spezifischen 1. Antikörper, der mit 5%igem Blocking-Reagenz verdünnt wurde (Tab. 2.10), über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Waschvorgang für 1x15min und 2x5min mit TBS-T. Anschließend wurden die Membranen dann mit dem horse-raddish-Peroxidase (HRP) markierten 2. Antikörper (Tab. 2.10) für 60min auf einem Schüttler inkubiert. Der 2. Antikörper lag in 5%igem Blocking-Reagenz in einer 1:10.000 Verdünnung vor. Danach erfolgte ein abschließender Waschvorgang für 1x15min und 2x5min mit TBS-T.

Tab. 2.10 Verwendete Antikörper für die Antikörperhybridisierung

1. Antikörper		2. Antikörper
Name	Verdünnung	Name
MC-20 anti-ERalpha, rabbit polyklonal, SantaCruz	1:1000	Donkey anti-rabbit, Dianova
anti-GAPDH, mouse, Chemicon	1:25000	Donkey anti-mouse, Dianova

MC-20 anti-ERalpha: spezifischer 1. Antikörper gegen ein Epitop von Östrogenrezeptor alpha, anti-GAPDH: spezifischer 1. Antikörper gegen ein Epitop von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

2.10.5 Detektion des Proteins mit Chemilumineszenz

Die Proteine wurden mit dem Chemilumineszenz-Verfahren detektiert. Dieses kam durch eine Oxidation von Luminol zustande, die durch die HRP des 2. Antikörpers katalysiert wurde. Dabei kam es zur Emission von Lichtwellen, die einen Röntgenfilm belichteten.

Alle Membranen wurden mit 5ml eines Detektions-Kits (ECL) für 4min überschichtet. Anschließend wurden die Membranen gekippt, sodass das Reagenz ablaufen konnte, und für etwa 30sec luftgetrocknet. Dann wurden die Membranen mit der zu detektierenden Seite nach unten gerichtet, in eine Cellophan-Folie verpackt und zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt. Der Röntgenfilm wurde für 2min (GAPDH) und zwischen 15min und 30min (ERalpha) mit dem Chemilumineszenzsignal belichtet, danach aus der Filmkassette genommen und in eine Entwicklermaschine gegeben. Es resultierten Banden auf der erwarteten Höhe (Abb. 3.12), die dann ausgewertet werden konnten.

Die entwickelten Röntgenfilme wurden in einen Durchsichtscanner gelegt, eingescannt und danach die Banden mithilfe der Software AlphaEase Version 5.5 (Alpha Innotec, USA) densitometrisch ausgewertet.

2.10.6 Auswertungs-Verfahren

Zur Korrektur von möglichen Varianzen im Protein-Transfer wurden die Dreifach-Ansätze des aufgetragenen Proteingemisches aller Proben gemittelt. So konnte ein Korrekturfaktor für jeden Elektro-Blot (2.10.2) erstellt werden.

Weiterhin wurde für jedes Ziel-Protein eine separate Verdünnungsreihe erstellt, anhand derer die Detektionskinetik der jeweiligen Hybridisierungsreaktion abgeschätzt wurde. Hierbei wurde die eingesetzte Proteinmenge gegen die gemessenen OD-Werte aufgetragen und mit einer Idealkurve verglichen. Daraufhin wurde eine Ausgleichsfunktion durch Regression erstellt, die auf jede einzelne Probe angewendet wurde.

Im letzten Schritt wurde in jeder Probe der Quotient von ERalpha durch GAPDH gebildet und somit die relative Proteinmenge angegeben.

2.11 Zellkultur mit humanen kardialen Fibroblasten

2.11.1 Gewinnung der Fibroblasten

Die humanen kardialen Fibroblasten wurden aus linksventrikulären Myokardproben isoliert, die nach Herzexplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) gewonnen wurden. Das Protokoll zur Fibroblasten-Gewinnung war bereits in der Arbeitsgruppe etabliert und publiziert⁵³. Aus den explantierten Herzen wurde jeweils ein etwa 4x4cm großes Myokardstück herausgetrennt und direkt in Nährmedium inkubiert. Nach gekühltem Transport der Probe ins Labor erfolgte umgehend die Isolation der Fibroblasten.

Die Isolationsschalen sowie alle Chemikalien wurden auf Eis gelagert. Die Isolation erfolgte unter semisterilen Bedingungen an einer Sterilbank laminAirFlow™. Zunächst wurden epi- und endokardiale Gewebereste vom Myokardstück entfernt. Anschließend wurde das Myokard in einer PBS-gefüllten Petrischale mit einem sterilen Skalpell in Stückchen (2mm) geschnitten, welche im Anschluß auf vier mit 10ml PBS-Lösung gefüllten Falcon-Röhrchen verteilt und auf Eis gelagert wurden. Es erfolgte eine 30min Inkubation der Stückchen mit 5ml eines Kollagenase-Dispase-Puffers bei 37°C im Wasserbad, um die Fibroblasten aus dem Zellverband zu lösen. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Falcon-Röhrchen aufgeschüttelt. Nach Sedimentation des noch nicht durch Kollagenase-Dispase Verdau aufgelösten Geweberestes konnte ein Überstand von etwa 4ml pro Falcon-Röhrchen abgenommen und in einem größeren 50ml Falcon-Röhrchen gesammelt werden. Die Inkubation der verbleibenden Gewebereste mit der Enzymlösung wurde solange wiederholt, bis augenscheinlich kein Restgewebe mehr vorhanden war.

Zu dem gesammelten Zell-Isolat wurde dann ein Isovolumen von 10% FCS-haltigem Zellkulturmedium (500ml Dulbecco's MEM „Low Glucose“, 50ml Fetal-Calf-Serum [FCS], 5ml HEPES, 5ml Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin) gegeben, um weitere Enzymaktivität zu unterbinden. Durch Zentrifugation des Zell-Isolats bei 1.500rpm und 4°C für 10min resultierte ein Pellet. Nach einmaliger Spülung mit PBS-Lösung wurde dieses Pellet in 20ml 10% FCS-haltigem Zellkulturmedium resuspendiert. Jeweils 10ml dieser Resuspension wurden auf eine Petrischale (75cm²) gegeben. Anschließend wurde die Petrischale im Brutschrank für 60min bei 37°C inkubiert. Das diente der Adhäsion der Fibroblasten an den Petrischalen. Danach wurde das Medium abgesaugt und jede einzelne Schale zweimal mit PBS-Lösung gespült, um die nicht-adhärenen Zellen und Gewebereste zu entfernen. Abschließend wurden auf die beiden Petrischalen jeweils 10ml 10% FCS-haltiges Zellkulturmedium gegeben und die Schalen im Brutschrank (begast mit 5% CO₂) bei 37°C inkubiert

2.11.2 Kultivierung und Passagierung der Fibroblasten

Zu Beginn dieser Experiment-Serie wurde ein Teil der isolierten Fibroblasten mit phenolrot-haltigem Medium kultiviert, später aber nur noch mit phenolrotfreiem Medium. Der Zusatzstoff Phenolrot scheint in unspezifischer Weise schwach östrogenartig zu wirken⁵⁴. Obwohl der relative Einfluss von Phenolrot auf verschiedene Zelltypen strittig ist⁵⁵, sollte dieser mögliche Effekt durch den Einsatz von phenolrotfreiem Medium umgangen werden.

Das Zellkulturmedium der Fibroblasten wurde in einem Abstand von vier Tagen gewechselt. Dazu wurde Zellkulturmedium mit einem Gehalt von 10% FCS verwendet. Nach etwa vier Wochen hatten sich die Fibroblasten konfluent auf den Schalen ausgebreitet und konnten passagiert werden. Das Medium wurde abgesaugt und pro Schale 2ml Trypsin/EDTA hinzugefügt. Durch Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen von den Petrischalen enzymatisch abgelöst, und dann in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde ein Isovolumen an 10% FCS-haltigem Medium hinzugegeben, um weitere Enzymaktivität zu unterbinden. Dann wurde eine Zentrifugation bei 1.300rpm und 4°C für 5min durchgeführt und der Überstand verworfen. Nach Resuspension des entstandenen Pellets mit 10% FCS-haltigem Zellkulturmedium wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:4 auf acht Petrischalen aufgeteilt.

Die Petrischalen wurden alle vier Tage mit neuem Medium versetzt, bis die Zellen erneut konfluente Ausbreitung zeigten. Es erfolgte dann eine zweite Passagierung der Fibroblasten nach dem gleichen Verfahren, bevor die Stimulationsversuche (2.11.3) durchgeführt wurden.

2.11.3 Stimulation der Fibroblasten mit 17beta-Estradiol

2.11.3.1 Herstellung einer 17beta-Estradiol Stammlösung

17beta-Estradiol wurde in Pulverform geliefert. Als Solvens für das Pulver wurde 100% Ethanol verwendet. Die daraus entstandene Lösung wurde mit 100% Ethanol stufenweise auf 10^{-4} M verdünnt. Im letzten Verdünnungsschritt wurde diese Lösung im Verhältnis 1:10 mit PBS auf 10^{-5} M zur 17beta-Estradiol Stammlösung verdünnt. Das Solvens Ethanol lag in der 17beta-Estradiol Stammlösung mit 10 v/v% vor.

2.11.3.2 Herstellung einer Solvens-Stammlösung

Für die Verwendung in Kontrollschalen wurde eine reine Solvens-Stammlösung erstellt. Dazu wurde 100% Ethanol 1:10 mit PBS verdünnt, sodass das Ethanol in dieser Solvens-Stammlösung mit 10 v/v% vorlag.

2.11.3.3 Stimulationsversuch mit 17beta-Estradiol für 6h und 24h

Nachdem die Zellen in der zweiten Passage konfluent ausgebreitet waren, wurde der Stimulationsversuch durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen für 48h mit 10ml von 0.4% FCS-haltigem Zellkulturmedium versetzt. Mit dem niedrigen Gehalt an FCS sollte der unspezifische Einfluss von Wachstumsfaktoren im FCS auf das Stimulationsergebnis minimiert werden. Zum Stimulationsbeginn wurde dieses Medium abgesaugt und 10ml von frischem, 0.4% FCS-haltigem Zellkulturmedium hinzugegeben. Zu diesem Medium wurde in die Kontrollschalen 100µl der Solvens-Stammlösung und in die Stimulationsschalen 100µl der 17beta-Estradiol Stammlösung gegeben. Somit lag Ethanol in allen Schalen mit 0.1 v/v% vor und 17beta-Estradiol in den Stimulationsschalen mit 10^{-7} M.

Nach Zugabe der Stammlösungen wurden alle Petrischalen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ein Teil der Schalen wurde für 6h im Brutschrank belassen, ein anderer Teil für 24h. Nach der Inkubationsphase wurde das Medium von den Petrischalen abgesaugt und – nach Waschung der Petrischalen mit PBS-Lösung - die RNA der humanen, kardialen Fibroblasten extrahiert (2.6.2).

2.12 Statistik

Alle Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Zum Vergleich von Gruppen wurde zunächst auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Bei dem Vergleich von zwei Gruppen wurde bei Normalverteilung der Student's t-Test, ansonsten der Mann-Whitney U-Test verwendet. Bei dem Vergleich von mehreren Gruppen wurde bei Normalverteilung eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit ‚Bonferroni‘ post-Test durchgeführt, ansonsten ein Kruskal-Wallis-Test mit ‚Dunn‘ post-Test. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson ermittelt. Analysen von Kontingenztafeln wurden mit Fisher's exaktem Test oder mit einem Chi-Quadrat-Test (1 Freiheitsgrad) durchgeführt. Die Untersuchungen zu Expressionsveränderungen in Fibroblasten wurden mit einem Wilcoxon-Rang-Test analysiert. Werte ab $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. Die nicht signifikanten p-Werte wurden bis auf den Dunn post-Test exakt angegeben, dort konnte nur der Grenzwert $p > 0.05$ angegeben werden.

Zur Erstellung des Texts und der Grafiken, sowie der Statistik wurden kommerziell erhältliche Software-Programme (Microsoft Windows XP, Microsoft Office 2003, SigmaPlot Version 8.0, SPSS Version 11.0, GraphPad InStat3, EndNote 7.0) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation von ER mRNA in humanen Myokardproben

3.1.1 Expression von ERalpha mRNA in Myokardproben von Kontrollen

Die basale Expressionshöhe von ERalpha wurde nicht vom Geschlecht beeinflusst. Die Expression von ERalpha war bei Frauen und Männern nicht signifikant verschieden ($p=0.15$, Tab. 3.1 und Abb. 3.1A). Dies wurde auch bestätigt, nachdem eine Altersaufteilung in jeder Geschlechtergruppe durchgeführt wurde (Tab. 3.1 und Abb. 3.1C). Anschließend wurden alle Kontrollen ≤ 50 LJ mit denjenigen >50 LJ unabhängig vom Geschlecht verglichen. Dabei zeigte sich ebenfalls keine unterschiedliche Expression ($p=0.40$, Tab. 3.1 und Abb. 3.1B). Weiterhin zeigte sich keine Korrelation zwischen ERalpha mRNA und dem Alter der Kontrollen ($n=24$, $r=0.317$, $p=0.13$, Abb. 3.1D).

Tab. 3.1 ERalpha /GAPDH mRNA in Kontrollproben

Kontrollen, Frauen [n=10]		Kontrollen, Männer [n=14]	
0.64 ± 0.08		0.82 ± 0.09	
≤50 LJ [n=3]	>50 LJ [n=7]	≤50 LJ [n=7]	>50 LJ [n=7]
0.52 ± 0.02	0.69 ± 0.12	0.72 ± 0.09	0.92 ± 0.14

Kontrollen, ≤50 LJ [n=10]	Kontrollen, >50 LJ [n=14]
0.66 ± 0.07	0.80 ± 0.09

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

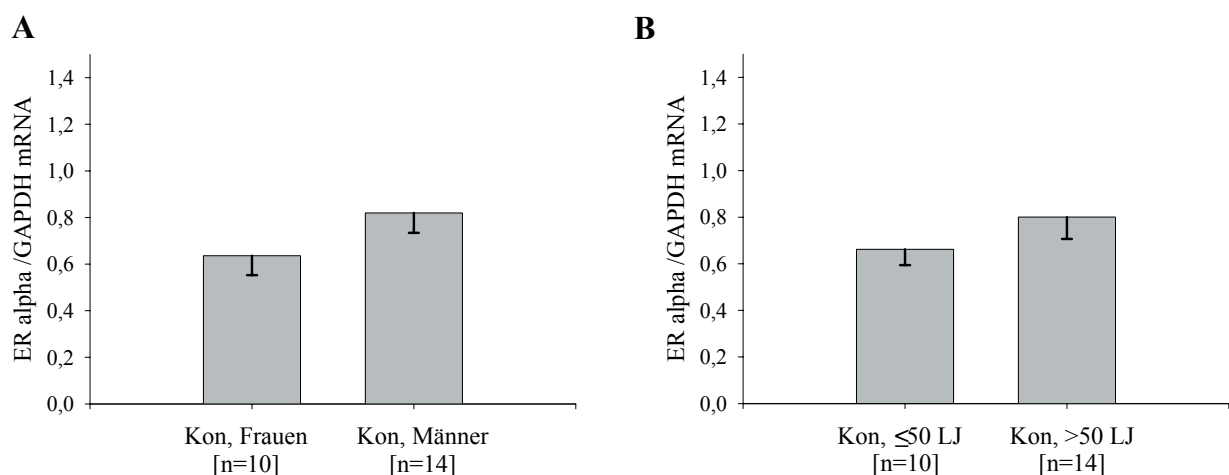


Abb. 3.1 ERalpha /GAPDH mRNA in Kontrollproben [n=24].

A: Unterteilung nach Geschlecht,

B: Unterteilung nach Altersgruppe.

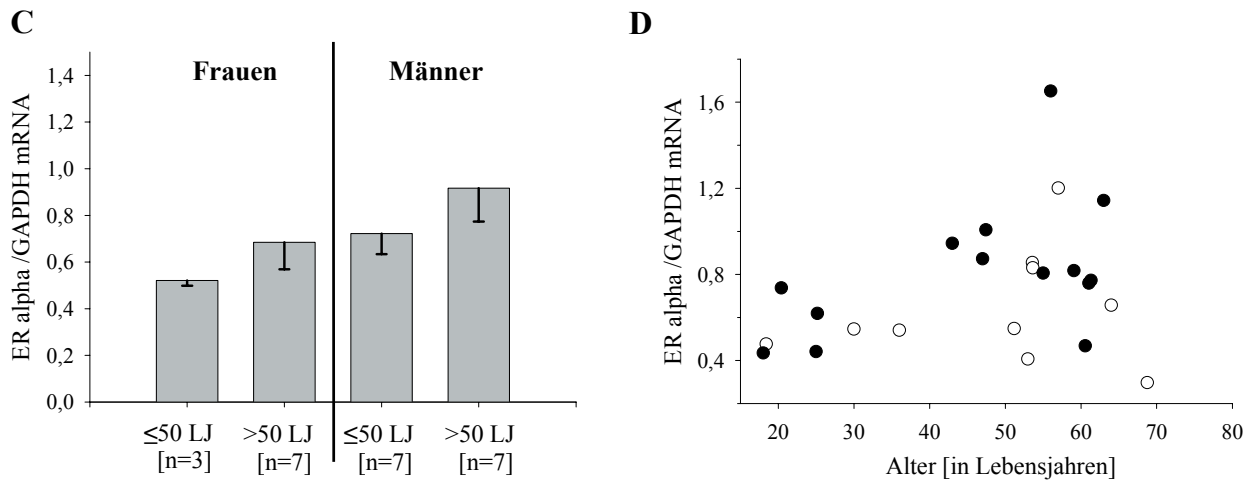


Abb. 3.1 ERalpha /GAPDH mRNA in Kontrollproben [n=24].

C: Unterteilung nach Geschlecht und Altersgruppe,

D: Korrelationsanalyse zwischen ERalpha /GAPDH mRNA und dem Lebensalter (○ Frauen, ● Männer).

3.1.2 Expression von ERbeta mRNA in Myokardproben von Kontrollen

Bei ERbeta wurde ein Geschlechterunterschied in der basalen Expression festgestellt. Die Männer hatten eine 2.0-fach höhere ERbeta-Expression als die Frauen ($p < 0.01$, Tab. 3.2 und Abb. 3.2A). Das Alter hatte keinen Einfluss auf die Expressionshöhe von ERbeta in Kontrollen ($p = 0.41$, Tab. 3.2 und Abb. 3.2B). Dies wurde auch bestätigt, nachdem die Altersaufteilung in jeder Geschlechtergruppe durchgeführt wurde (Tab. 3.2 und Abb. 3.2C). Weiterhin fehlte eine Korrelation zwischen ERbeta mRNA und dem Alter in Kontrollen ($n = 24$, $r = -0.072$, $p = 0.74$, Abb. 3.2D).

Tab. 3.2 ERbeta /GAPDH mRNA in Kontrollproben

Kontrollen, Frauen [n=10]		Kontrollen, Männer [n=14]	
0.14 ± 0.02		0.28 ± 0.03*	
≤50 LJ [n=3]	>50 LJ [n=7]	≤50 LJ [n=7]	>50 LJ [n=7]
0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.27 ± 0.03
Kontrollen, ≤50 LJ [n=10]		Kontrollen, >50 LJ [n=14]	
0.25 ± 0.04		0.21 ± 0.03	

* $p < 0.01$. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

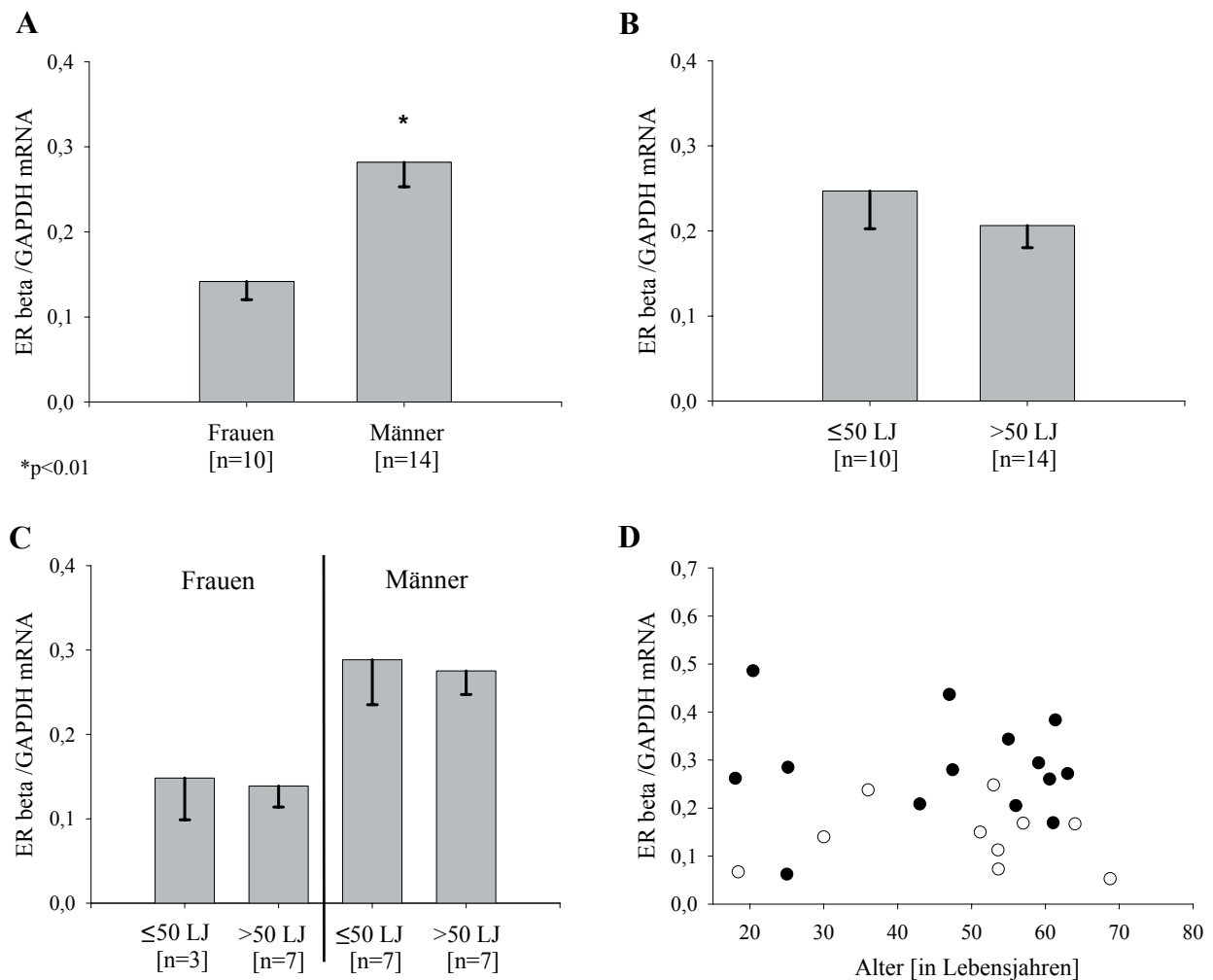


Abb. 3.2 ERbeta /GAPDH mRNA in Kontrollproben [n=24].

A: Unterteilung nach Geschlecht,

B: Unterteilung nach Altersgruppe,

C: Unterteilung nach Geschlecht und Altersgruppe,

D: Korrelationsanalyse zwischen ERbeta /GAPDH mRNA und dem Lebensalter (○ Frauen, ● Männer).

3.1.3 Folgerungen für die weitere Auswertungsstrategie

Bei ERalpha zeigte sich weder ein signifikanter Einfluss von Alter noch vom Geschlecht auf die basale Expressionshöhe in Kontrollproben. Hingegen wurde für ERbeta ein Geschlechterunterschied in der basalen Expressionshöhe gefunden.

Da sich bei ERalpha und ERbeta keine Altersabhängigkeit in der Expressionshöhe fand, wurde in den weiteren Untersuchungen folgende Strategie verfolgt, um die Krankheitsabhängigkeit der Expressions-Veränderungen abzugrenzen: Zunächst wurden alle untersuchten Patienten einer Krankheitsgruppe mit allen Kontrollen verglichen; anschließend wurden die Patientengruppen nach Geschlecht unterteilt und mit der entsprechenden Untergruppe der Kontrollproben verglichen.

3.1.4 Regulation von ERalpha mRNA in Myokardproben von Patienten mit AS

Die ERalpha mRNA war in der Gesamtgruppe der AS-Patienten 3.0-fach höher exprimiert als in allen Kontrollproben ($p < 0.001$, Tab. 3.3 und Abb. 3.3A). Weibliche und männliche AS-Patienten unterschieden sich nicht hinsichtlich der ERalpha mRNA Expression ($p > 0.05$, Tab. 3.1 und Abb. 3.3B). Anschließend wurden die Patienten nach Geschlecht unterteilt und mit der entsprechenden Untergruppe der Kontrollproben verglichen. Dabei wurde in der Gruppe der Frauen eine signifikant 3.9-fach höhere Expression gegenüber den Kontrollen gemessen ($p < 0.05$, Tab. 3.1 und Abb. 2B), und in der Gruppe der Männer eine nicht signifikante 2.2-fach höhere Expression ($p > 0.05$, Tab. 3.1 und Abb. 3.3B), die aber den Trend bestätigte.

Tab. 3.3 ERalpha /GAPDH mRNA in AS-Proben

Kontrollen [n=24]		AS [n=14]	
0.74 ± 0.06		2.19 ± 0.65**	

Frauen		Männer	
Kon [n=10]	AS [n=8]	Kon [n=14]	AS [n=6]
0.64 ± 0.08	2.49 ± 1.12*	0.82 ± 0.09	1.79 ± 0.38

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

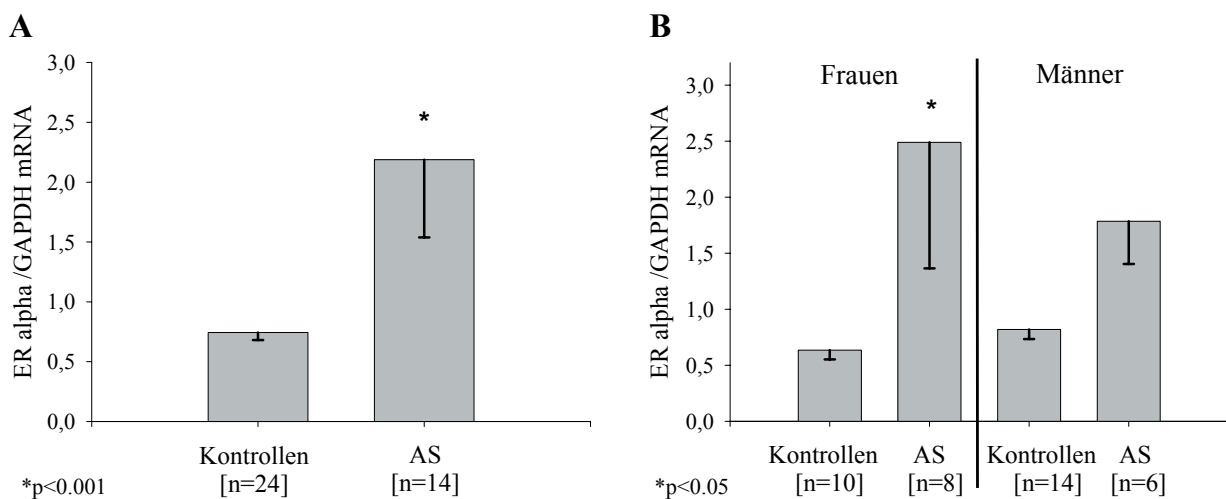


Abb. 3.3 ERalpha /GAPDH mRNA in AS [n=14] A: versus alle Kontrollen, B: Unterteilung nach Geschlecht und Vergleich mit Kontrollen.

3.1.5 Regulation von ERbeta mRNA in Myokardproben von Patienten mit AS

Die ERbeta mRNA war in allen Proben von AS-Patienten 2.6-fach höher exprimiert als in allen Kontrollen ($p < 0.001$, Tab. 3.4 und Abb. 3.4A). Der Gehalt an ERbeta mRNA war in weiblichen und männlichen Patienten nicht unterschiedlich ($p > 0.05$, Tab. 3.4 und Abb. 3.4B). Bei der Unterteilung nach Geschlecht wurde eine 4.3-fach höhere Expression von ERbeta mRNA bei weiblichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Kontrollen gemessen ($p < 0.001$, Tab. 3.4 und Abb. 3.4B). Bei männlichen Patienten wurde eine 1.9-fach höhere Expression von ERbeta mRNA gegenüber männlichen Kontrollen festgestellt ($p < 0.01$, Tab. 3.4 und Abb. 3.4B). Der prozentuale Anstieg der ERbeta mRNA im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen war in weiblichen Patienten signifikant höher als in männlichen Patienten ($n=8$, $433 \pm 51\%$ vs. $n=6$ $190 \pm 30\%$, $p < 0.01$).

Tab. 3.4 ERbeta /GAPDH mRNA in AS-Proben

Kontrollen [n=24]		AS [n=14]	
0.22 ± 0.02		0.57 ± 0.05***	
Frauen		Männer	
Kon [n=10]	AS [n=8]	Kon [n=14]	AS [n=6]
0.14 ± 0.02	0.61 ± 0.07**	0.28 ± 0.03	0.53 ± 0.08*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

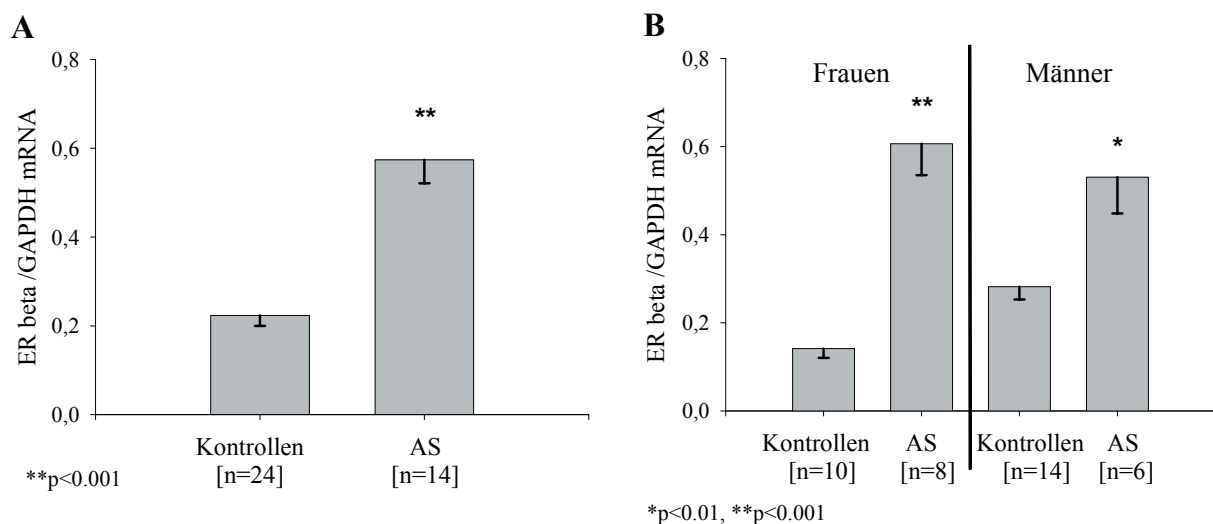


Abb. 3.4 ERbeta /GAPDH mRNA in AS [n=14] A: versus alle Kontrollen, B: Unterteilung nach Geschlecht und Vergleich mit Kontrollen.

3.1.6 Korrelation von ER mRNA zu klinischen Parametern in AS

Bei Patienten mit AS korrelierten ERbeta mRNA und linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) negativ miteinander ($n=10$, $r=-0.70$, $p<0.05$, Tab. 3.5 und Abb. 3.5). Bei der Analyse von Untergruppen ergab sich, dass die negative Korrelation nur in weiblichen Patienten mit AS statistische Signifikanz erreichte, nicht aber in männlichen Patienten ($n=5$, $r=-0.99$, $p<0.001$ versus $n=5$, $r=-0.43$, $p=0.47$, Abb. 3.5). Dies könnte jedoch auf die geringe Probenzahl und einen möglichen Ausreißer-Wert bei den Männern zurückzuführen sein. Weitere Korrelationen zwischen ER mRNA und anderen gemessenen klinischen Parametern wurden nicht gefunden (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Korrelation von ER mRNA zu klinischen Parametern in AS

klinische Parameter	Korrelationen zu	
	ERalpha /GAPDH mRNA	ERbeta /GAPDH mRNA
δp mean [mmHg]	$r=0.34$, $p=0.26$	$r=0.25$, $p=0.42$
LVEF [%]	$r=0.03$, $p=0.93$	$r=-0.70$, $p<0.05$
LVEDD [mm]	$r=-0.03$, $p=0.92$	$r=0.18$, $p=0.55$
FS [%]	$r=0.08$, $p=0.81$	$r=0.09$, $p=0.78$
LVEDP [mmHg]	$r=-0.40$, $p=0.32$	$r=-0.10$, $p=0.81$

Fettgedruckt: dies stellt einen signifikanten Wert dar. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

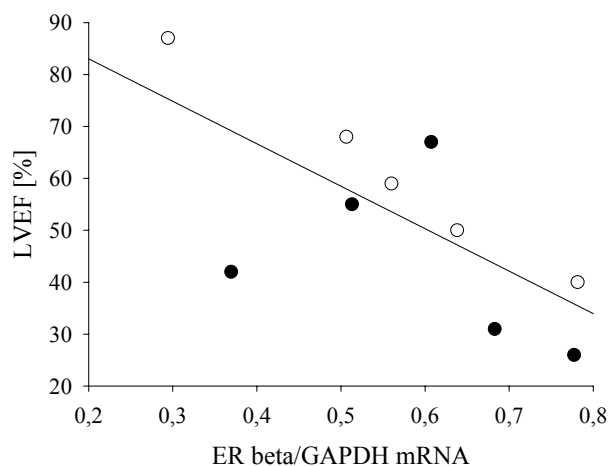


Abb. 3.5 Korrelation von ERbeta /GAPDH mRNA mit LVEF in AS (○ Frauen, ● Männer).

3.1.7 Korrelation von ER mRNA zu Hypertrophie-assoziierten Genen in AS

Bei dieser Untersuchung fanden sich negative Korrelationen zwischen ERbeta und CnA beta (n=11, r=-0.89, p<0.001, Tab. 3.6 und Abb. 3.6), sowie zu CnB (n=10, r=-0.88, p<0.001, Tab. 3.6 und Abb. 3.6). Die weiteren Analysen ergaben keine statistisch signifikanten Korrelationen (Tab. 3.6).

Tab. 3.6 Korrelation von ER mRNA zu Hypertrophie-assoziierten Genen in AS

Hypertrophie-assoziierte Gene	Korrelationen zu	
	ERalpha /GAPDH mRNA	ERbeta /GAPDH mRNA
ERalpha /GAPDH mRNA	-	r= 0.09, p=0.77
BNP /GAPDH mRNA	r=-0.31, p=0.38	r= 0.13, p=0.92
CnA beta /GAPDH mRNA	r= 0.22, p=0.52	r=-0.89, p<0.001
CnB /GAPDH mRNA	r=-0.15, p=0.67	r=-0.88, p<0.001

Fettgedruckt: dies stellt einen signifikanten Wert dar. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

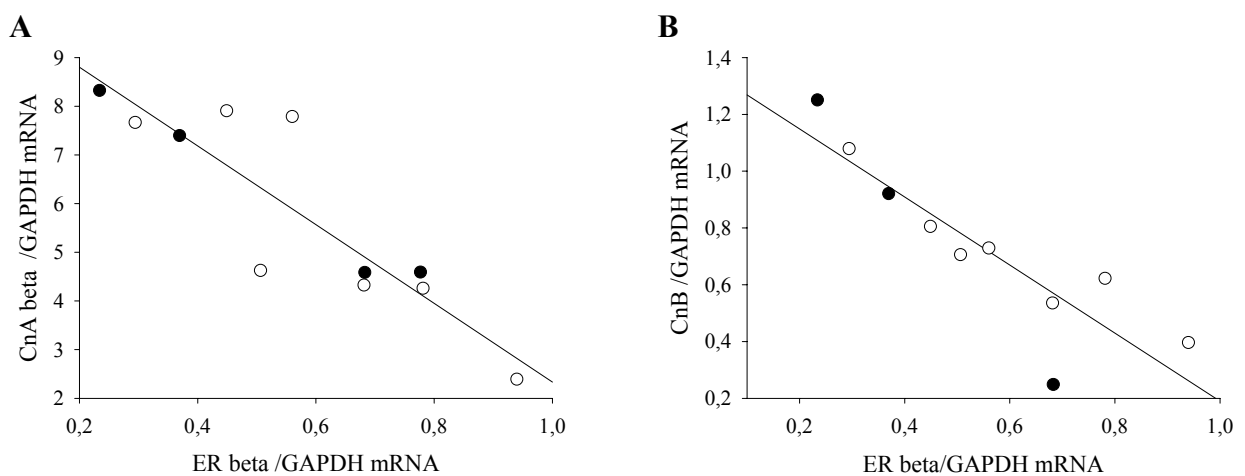


Abb. 3.6 Korrelation von ERbeta mRNA in AS mit A: CnA beta, B: CnB (○ Frauen, ● Männer).

3.1.8 ER-Expression im Bezug auf die Medikation in AS

Es wurde für kein Medikament eine signifikante Interaktion mit der ER mRNA Expression gefunden. Dies galt sowohl für die Gabe eines RAS-Inhibitors (Tab. 3.7) als auch eines Betablockers (Tab. 3.8). Die Untersuchung des Einflusses der übrigen kardiovaskulären Medikamente war statistisch nicht möglich oder sinnvoll, da keine ausgewogenen Untergruppen gebildet werden konnten (12 von 14 Patienten bekamen ein Diuretikum und 3 von 14 Patienten ein Digitalispräparat).

Tab. 3.7 ER mRNA im Bezug auf RAS-Inhibitor-Gabe in AS

Genexpression in AS	RAS-Inhibitor (RAI) +	RAS-Inhibitor (RAI) -
	[n=8]	[n=6]
ERalpha /GAPDH mRNA	2.89 ± 1.09	1.25 ± 0.17
ERbeta /GAPDH mRNA	0.55 ± 0.07	0.61 ± 0.09

Tab. 3.8 ER mRNA im Bezug auf Betablocker-Gabe in AS

Genexpression in AS	Betablocker (BB) +	Betablocker (BB) -
	[n=7]	[n=7]
ERalpha /GAPDH mRNA	2.97 ± 1.24	1.40 ± 0.31
ERbeta /GAPDH mRNA	0.55 ± 0.06	0.60 ± 0.09

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

Der Gebrauch von Hormontherapie (HT) konnte nur bei zwei Patientinnen ermittelt werden. Die gemessenen ER-Werte der beiden AS-Patientinnen mit HT (ERalpha: 2.05±0.57, ERbeta: 0.49±0.19) lagen jedoch im Bereich des Mittelwertes der gesamten Gruppe der AS-Patientinnen (ERalpha: 2.49±1.12, ERbeta: 0.61±0.07).

3.1.9 Regulation von ERalpha mRNA in Myokardproben von Patienten mit DCM

Die Expression von ERalpha mRNA war in allen Proben von DCM-Patienten 1.8-fach höher als in allen Kontrollen ($p < 0.001$, Tab. 3.9 und Abb. 3.7). Der Gehalt an ERalpha mRNA war in weiblichen und männlichen Patienten nicht unterschiedlich ($p > 0.05$, Tab. 3.9 und Abb. 3.7). Bei der Unterteilung nach Geschlecht wurde bei den Frauen eine 1.9-fach höhere Expression bei DCM-Patientinnen gegenüber den Kontrollen gemessen, wobei dieser Befund aufgrund der geringen Fallzahl statistisch nicht signifikant war ($p > 0.05$, Tab. 3.9 und Abb. 3.7). In der Untergruppe der Männer fand sich ebenfalls eine nicht signifikante 1.6-fach höhere Expression ($p > 0.05$ Tab. 3.9 und Abb. 3.7), die aber den Trend bestätigte.

Tab. 3.9 ERalpha /GAPDH mRNA in DCM-Proben

Kontrollen [n=24]		DCM [n=24]	
0.74 ± 0.06		1.33 ± 0.16**	

Frauen		Männer	
Kon [n=10]	DCM [n=2]	Kon [n=14]	DCM [n=22]
0.64 ± 0.08	1.21 ± 0.05	0.82 ± 0.09	1.34 ± 0.18

** $p < 0.001$. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

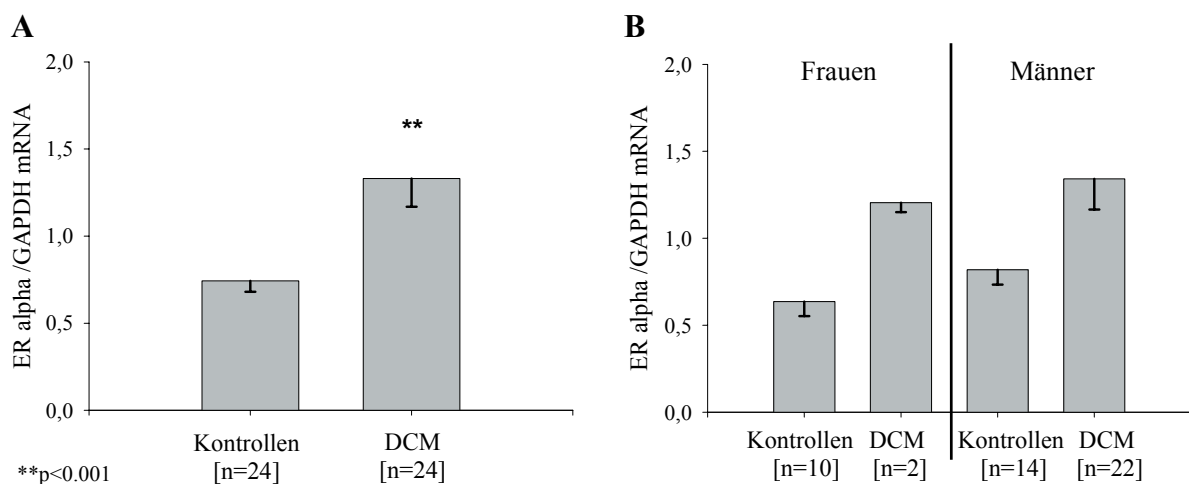


Abb. 3.7 ERalpha /GAPDH mRNA in DCM [n=24] A: versus Kontrollen, B: Unterteilung nach Geschlecht und Vergleich mit Kontrollen.

3.1.10 Regulation von ERbeta mRNA in Myokardproben von Patienten mit DCM

Der Gehalt an ER beta mRNA war in allen Proben von Patienten mit DCM 1.4-fach höher als in allen Kontrollen ($p < 0.05$, Tab. 3.10 und Abb. 3.8A). Dieser signifikante Befund in der Gesamtgruppe könnte dadurch zustande kommen, dass die ERbeta mRNA in weiblichen Kontrollen niedriger als bei den männlichen exprimiert war (Tab. 3.2 und Abb. 3.2), die DCM-Gruppe aber vorwiegend aus Männern bestand (22 von 24 Proben). In den Untergruppen zeigte sich keine Erhöhung der ERbeta mRNA bei den Männern ($p > 0.05$, Tab. 3.10 und Abb. 3.8B). Bei den Frauen war wiederum keine sinnvolle statistische Aussage möglich ($p > 0.05$, Tab. 3.10 und Abb. 3.8B).

Tab. 3.10 ERbeta /GAPDH mRNA in DCM-Proben

Kontrollen [n=24]		DCM [n=24]	
0.22 ± 0.02		0.31 ± 0.03*	

Frauen		Männer	
Kon [n=10]	DCM [n=2]	Kon [n=14]	DCM [n=22]
0.14 ± 0.02	0.29 ± 0.15	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.03

* $p < 0.05$. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

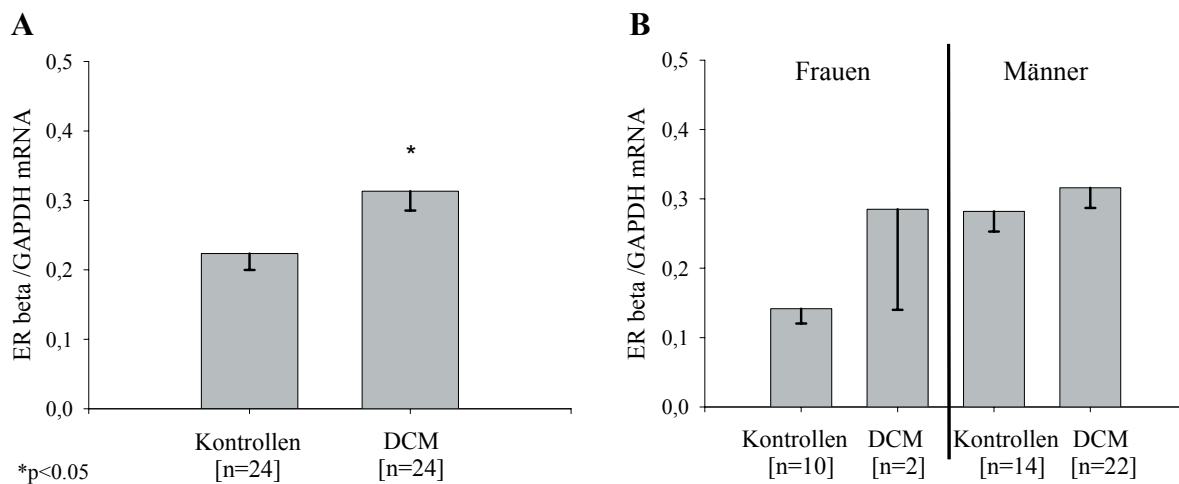


Abb. 3.8 ERbeta /GAPDH mRNA in DCM [n=24] A: versus Kontrollen, B: Unterteilung nach Geschlecht.

3.1.11 Korrelation von ER mRNA zu klinischen Parametern in DCM

Die Expressionshöhe der ER mRNA korrelierte in den Myokardproben von Patienten mit DCM mit keinem gemessenen klinischen Parameter (Tab. 3.11).

Tab. 3.11 Korrelation von ER mRNA zu klinischen Parametern in DCM

Klinische Parameter	Korrelationen zu	
	ERalpha /GAPDH mRNA	ERbeta /GAPDH mRNA
LVEF [%]	r= 0.03, p=0.94	r=-0.03, p=0.94
LVEDD [mm]	r=-0.38, p=0.07	r=-0.21, p=0.34
FS [%]	r=-0.07, p=0.73	r= 0.05, p=0.81

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

3.1.12 Korrelation von ER mRNA zu Herzinsuffizienz-assoziierten Genen in DCM

Der Gehalt an ER mRNA korrelierte in den Myokardproben von Patienten mit DCM weder untereinander noch mit Herzinsuffizienz-assoziierten Genen (Tab. 3.12).

Tab. 3.12 Korrelation von ER mRNA zu Herzinsuffizienz-assoziierten Genen in DCM

Herzinsuffizienz-assoziierte Gene	Korrelationen zu	
	ERalpha /GAPDH mRNA	ERbeta /GAPDH mRNA
ERalpha /GAPDH mRNA	-	r= 0.33, p=0.11
BNP /GAPDH mRNA	r= 0.11, p=0.70	r= 0.01, p=0.99
CnA beta /GAPDH mRNA	r=-0.13, p=0.66	r=-0.22, p=0.45
CnB /GAPDH mRNA	r= 0.45, p=0.11	r= 0.10, p=0.74

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

3.1.13 ER-Expression im Bezug auf die Medikation in DCM

Diese Untersuchung war in der Gruppe der DCM-Patienten statistisch nicht möglich oder sinnvoll, da eine sehr ähnliche kardiovaskuläre Medikation eingesetzt wurde. 24 von 24 Patienten erhielten ein Diuretikum, 22 von 24 Patienten bekamen einen RAS-Inhibitor, 21 von 24 Patienten einen Betablocker, sowie 22 von 24 Patienten ein Digitalispräparat.

Der Gebrauch von HT konnte bei keiner Patientin aus der DCM-Patientengruppe ermittelt werden.

3.2 Regulation von ERalpha Protein in humanen Myokardproben

Wie bei der ER mRNA-Untersuchung wurden zunächst die Kontrollproben untersucht, um den Einfluss von Alter und Geschlecht zu überprüfen. Dann wurden das ERalpha Protein in den Patientengruppen mit der Kontrollgruppe verglichen.

3.2.1 ERalpha Protein in Kontrollproben

Der Gehalt an ERalpha Protein wurde nicht vom Geschlecht beeinflusst, denn die Werte der Frauen und Männern waren nicht signifikant verschieden ($p=0.55$, Tab. 3.13 und Abb. 3.9). Anschließend wurden alle Kontrollen ≤ 50 LJ mit denjenigen >50 LJ unabhängig vom Geschlecht verglichen. Dabei wurde keine unterschiedliche Expression von ERalpha mRNA bei Kontrollen ≤ 50 LJ gegenüber >50 LJ gefunden ($p=0.31$, Tab. 3.13 und Abb. 3.9). Dies wurde auch gefunden, nachdem die Altersaufteilung in jeder Geschlechtergruppe durchgeführt wurde (Tab. 3.13 und Abb. 3.9). Der Gehalt an ERalpha Protein korrelierte nicht zum Alter ($n=16$, $r=-0.33$, $p=0.22$, Abb. 3.9).

Tab. 3.13 ERalpha /GAPDH Protein in Kontrollproben

Kontrollen, Frauen [n=7]		Kontrollen, Männer [n=9]	
0.62 ± 0.07		0.72 ± 0.15	
≤50 LJ [n=3]	>50 LJ [n=4]	≤50 LJ [n=5]	>50 LJ [n=4]
0.75 ± 0.07	0.53 ± 0.08	0.78 ± 0.25	0.65 ± 0.13
Kontrollen, ≤50 LJ [n=8]		Kontrollen, >50 LJ [n=8]	
0.77 ± 0.15		0.59 ± 0.07	

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

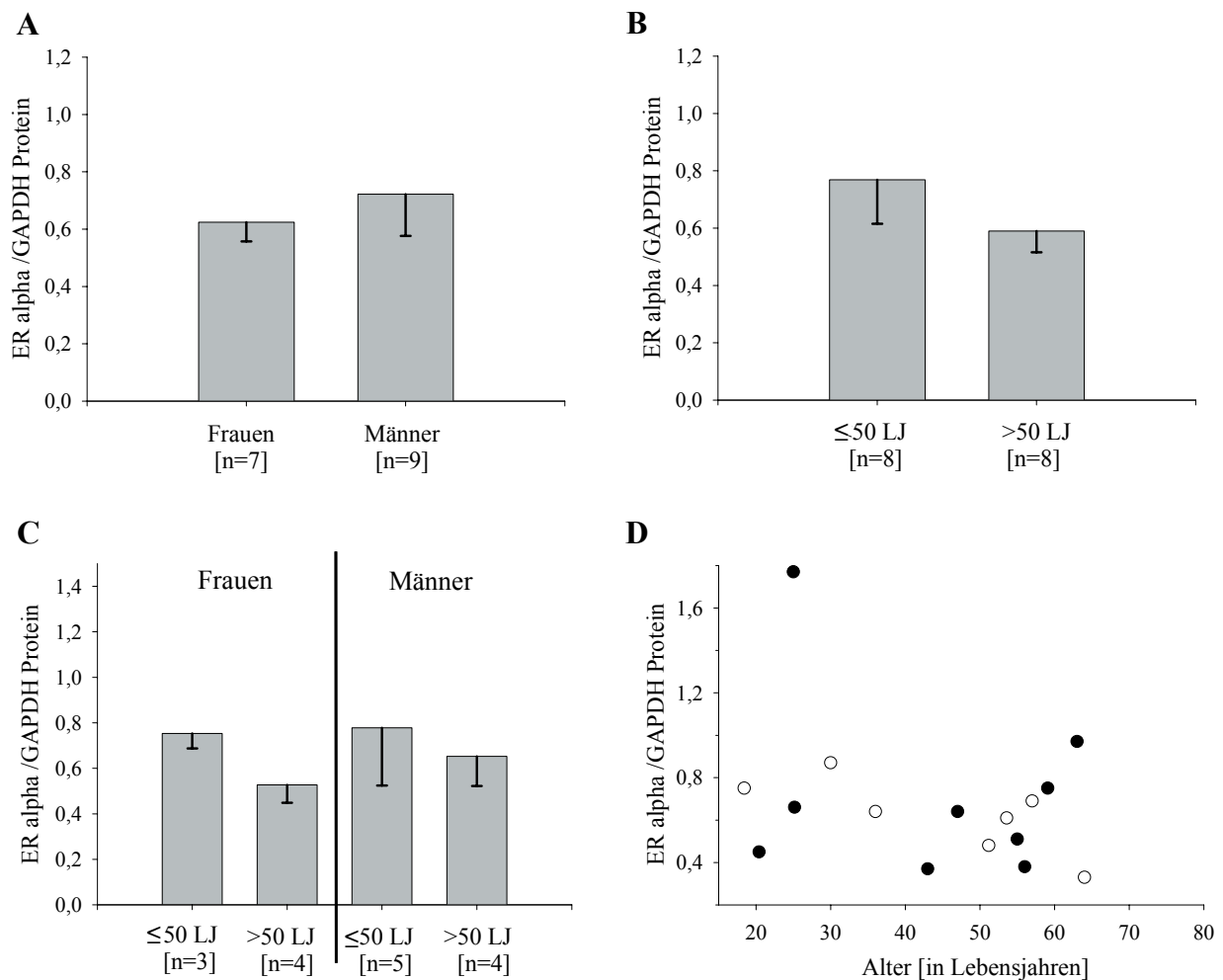


Abb. 3.9 ERalpha /GAPDH Protein in Kontrollproben [n=16].

A: Unterteilung nach Geschlecht,

B: Unterteilung nach Altersgruppe,

C: Unterteilung nach Geschlecht und Altersgruppe,

D: Korrelationsanalyse zwischen ERalpha /GAPDH Protein und dem Lebensalter (○ Frauen, ● Männer).

3.2.2 Folgerungen für die weitere Auswertungsstrategie

Die Analyse des Proteingehaltes von ERalpha in Kontrollen war Grundlage für die Untersuchung möglicher, krankheitsabhängiger Veränderungen.

Da sich keine Altersabhängigkeit des ERalpha Proteingehalts fand und ein Vergleich mit den mRNA Befunden ermöglicht werden sollte, wurden alle untersuchten Patienten einer Krankheitsgruppe mit allen Kontrollen verglichen. Anschließend wurden die Patientengruppen nach Geschlecht unterteilt und mit den entsprechenden Patienten der Kontrollproben verglichen.

3.2.3 ERalpha Protein in Myokardproben von AS-Patienten

Der ERalpha Proteingehalt war in allen Proben von AS-Patienten 1.5-fach höher als in allen Kontrollen ($p < 0.05$, Tab. 3.14, Abb. 3.10 und Abb. 3.12). Weibliche und männliche Patienten mit AS unterschieden sich nicht hinsichtlich des ER alpha Proteingehalts ($p > 0.05$, Tab. 3.14 und Abb. 3.10). In der Gruppe der Frauen zeigten die AS-Patientinnen 1.5-fach höhere ERalpha-Werte als die Kontrollen, wobei dieser Trend statistisch nicht signifikant war ($p > 0.05$, Tab. 3.14 und Abb. 3.10). Auch in der Gruppe der Männer tendierten die AS-Patienten zu 1.4-fach höheren ERalpha-Werten gegenüber den Kontrollen, was aber ebenfalls statistisch nicht signifikant war ($p > 0.05$, Tab. 3.14 und Abb. 3.10).

Tab. 3.14 ERalpha /GAPDH Protein in AS-Proben

Kontrollen [n=16]		AS [n=11]	
0.68 ± 0.09		0.99 ± 0.10*	

Frauen		Männer	
Kon [n=7]	AS [n=6]	Kon [n=9]	AS [n=5]
0.62 ± 0.07	0.96 ± 0.15	0.72 ± 0.15	1.02 ± 0.16

* $p < 0.05$. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

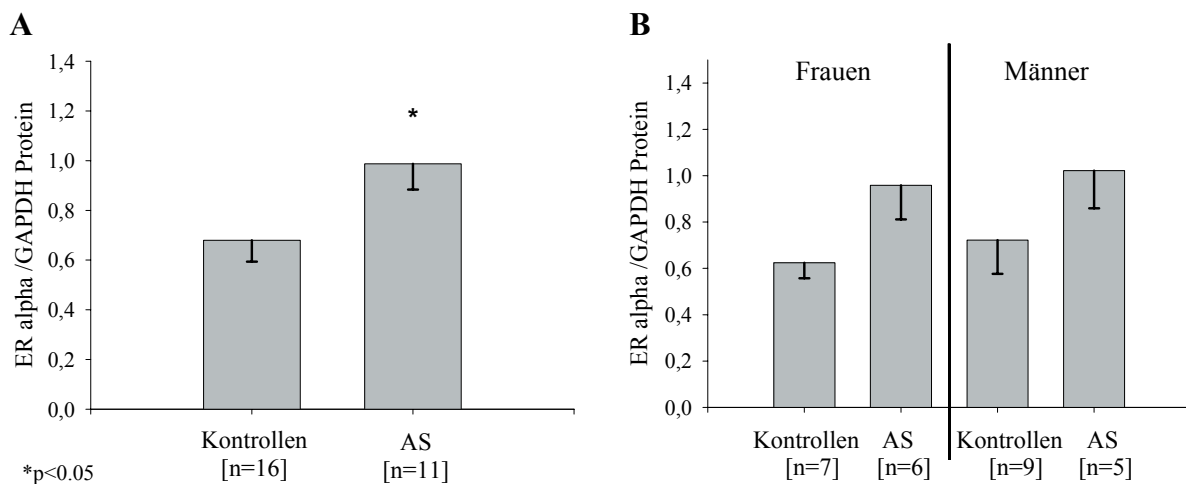


Abb. 3.10 ERalpha /GAPDH Protein in AS [n=14]

A: versus Kontrollen, B: Unterteilung nach Geschlecht und Vergleich mit Kontrollen.

3.2.4 Korrelation von ERalpha Protein zu klinischen Parametern in AS

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen ERalpha Protein und den gemessenen klinischen Parametern (Tab. 3.15).

Tab. 3.15 Korrelation von ERalpha /GAPDH Protein zu klinischen Parametern in AS

Klinische Parameter	Korrelationen zu ERalpha /GAPDH Protein
Δp mean [mmHg]	r= 0.002, p=0.99
LVEF [%]	r=-0.45, p=0.38
LVEDD [mm]	r= 0.52, p=0.12
FS [%]	r=-0.10, p=0.78
LVEDP [mmHg]	r= 0.49, p=0.41

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

3.2.5 ERalpha Protein im Bezug auf die Medikation in AS

Es wurde für kein Medikament eine signifikante Beeinflussung des ERalpha Proteingehaltes gefunden. Dies galt sowohl für die Gabe eines RAS-Inhibitors (Tab. 3.16) als auch eines Betablockers (Tab. 3.17). Die Untersuchung des Einflusses der übrigen kardiovaskulären Medikation war statistisch nicht möglich oder sinnvoll, da 9 von 11 Patienten ein Diuretikum bekamen und 3 von 11 Patienten ein Digitalispräparat.

Tab. 3.16 ERalpha Protein im Bezug auf RAS-Inhibitor-Gabe in AS

Proteinexpression in AS	RAS-Inhibitor (RAI) + [n=6]	RAS-Inhibitor (RAI) - [n=5]
ERalpha /GAPDH Protein	0.90 ± 0.14	1.09 ± 0.15

Tab. 3.17 ERalpha Protein im Bezug auf beta-Blocker-Gabe in AS

Proteinexpression in AS	Betablocker (BB) + [n=5]	Betablocker (BB) - [n=6]
ERalpha /GAPDH Protein	0.90 ± 0.15	1.06 ± 0.15

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

Der Gebrauch von Hormontherapie (HT) konnte nur bei einer Patientin ermittelt werden. Der gemessene Wert (1.15) lag im Bereich des Mittelwertes der Gesamtgruppe der AS-Patientinnen (0.96 ± 0.15).

3.2.6 ERalpha Protein in Patienten mit DCM

Der Proteingehalt von ERalpha war in allen Proben von DCM-Patienten 1.9-fach höher als in allen Kontrollen ($p < 0.001$, Tab. 3.18, Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Da nur eine Patientin mit DCM untersucht wurde, konnten keine statistische Aussagen in der Untergruppe der Frauen getroffen werden. Die Patientin wies aber einen höheren ERalpha-Wert gegenüber den Kontrollen auf (Tab. 3.18 und Abb. 3.11). In der Gruppe der Männer hatten die DCM-Patienten 1.6-fach höhere ERalpha-Werte als die Kontrollen ($p < 0.01$, Tab. 3.18 und Abb. 3.11).

Tab. 3.18 ERalpha /GAPDH Protein in DCM-Proben

Kontrollen [n=16]		DCM [n=27]	
0.68 ± 0.09		1.31 ± 0.14**	

Frauen		Männer	
Kon [n=7]	DCM [n=1]	Kon [n=9]	DCM [n=26]
0.62 ± 0.07	3.28 ± 0.00	0.72 ± 0.15	1.24 ± 0.12*

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

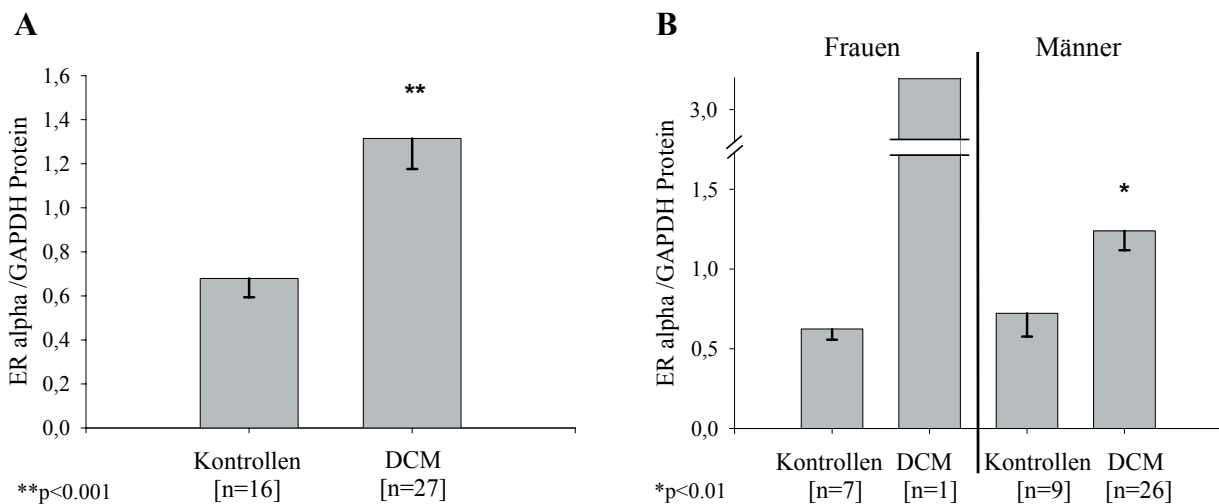


Abb. 3.11 ERalpha /GAPDH Protein in DCM [n=27] A: versus Kontrollen, B: Unterteilung nach Geschlecht und Vergleich mit Kontrollen.

3.2.7 Korrelation von ERalpha Protein zu klinischen Parametern in DCM

Es wurde keine Korrelation zwischen ERalpha Protein und den gemessenen klinischen Parametern gefunden (Tab. 3.19).

Tab. 3.19 Korrelation von ERalpha /GAPDH Protein zu klinischen Parametern in DCM

Klinische Parameter	Korrelationen zu ERalpha /GAPDH Protein
LVEF [%]	$r= 0.29, p=0.34$
LVEDD [mm]	$r= 0.06, p=0.77$
FS [%]	$r= 0.13, p=0.53$

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

3.2.8 ERalpha Protein im Bezug auf die kardiovaskuläre Medikation in DCM

Die Untersuchung war in der Gruppe der DCM-Patienten statistisch nicht möglich oder sinnvoll, da die kardiovaskuläre Medikation in der DCM-Gruppe sehr ähnlich angesetzt wurde. 27 von 27 Patienten erhielten ein Diuretikum, 27 von 27 Patienten bekamen eine RAI, 25 von 27 Patienten einen BB, sowie 25 von 27 Patienten ein Digitalispräparat.

Der Gebrauch von HT konnte bei keiner Patientin aus der DCM-Patientengruppe ermittelt werden.

3.2.9 Repräsentative Ausschnitte eines Western-Blots

In Abb. 3.12 sind repräsentative Ausschnitte eines Western-Blots mit Myokardproben von Kontrollen, AS und DCM gezeigt. Man sieht die Heraufregulation von ERalpha Protein in den AS- und DCM-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben.

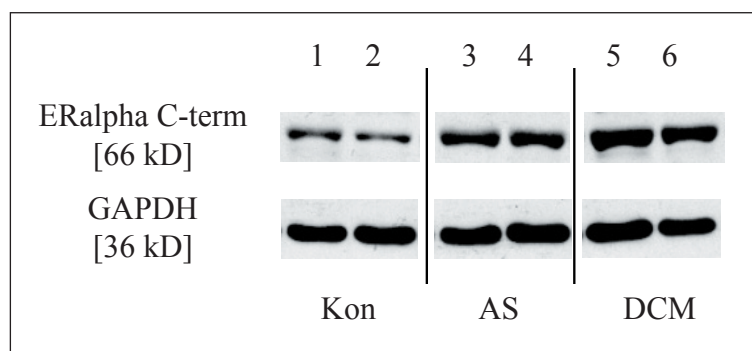


Abb. 3.12 Repräsentative Ausschnitte eines Western-Blots mit Myokardproben von Kontrollen [1 und 2], AS [3 und 4] und DCM [5 und 6].

3.3 Analyse eines SNP in Exon 4 des für ERalpha kodierenden Gens

3.3.1 Schmelzkurven und Sequenzierungsanalyse

Die Schmelzkurven nach der ERalpha PCR (2.7.4.2) zeigten zwei unterschiedliche Gipfel (bei ca. 64°C und 68°C, Abb. 3.13). Bei einem Teil der Proben war jeweils nur einer der beiden Gipfel sichtbar, bei dem anderen Teil der Proben zeigte sich ein doppelgipfliges Muster (Abb. 3.13). Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Phänomen um die Darstellung eines SNP handelte.

Nach der Sequenzierungsanalyse konnte festgestellt werden, dass es sich um einen bereits bekannten SNP in Codon 325 von Exon 4 (CCC → CCG) des für ERalpha kodierenden Gens handelte (NCBI, Reference SNP, Cluster report: rs1801132). Es befanden sich unter den untersuchten Myokardproben sowohl homozygote Patienten mit dem Genotypen C/C und G/G, als auch heterozygote mit dem Genotypen C/G. Jeder Genotyp konnte einem Schmelzgipfel-Muster zugeordnet werden (Abb. 3.13) woraufhin die Genotypisierung der untersuchten Proben anschließend nur noch mithilfe der Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wurde.

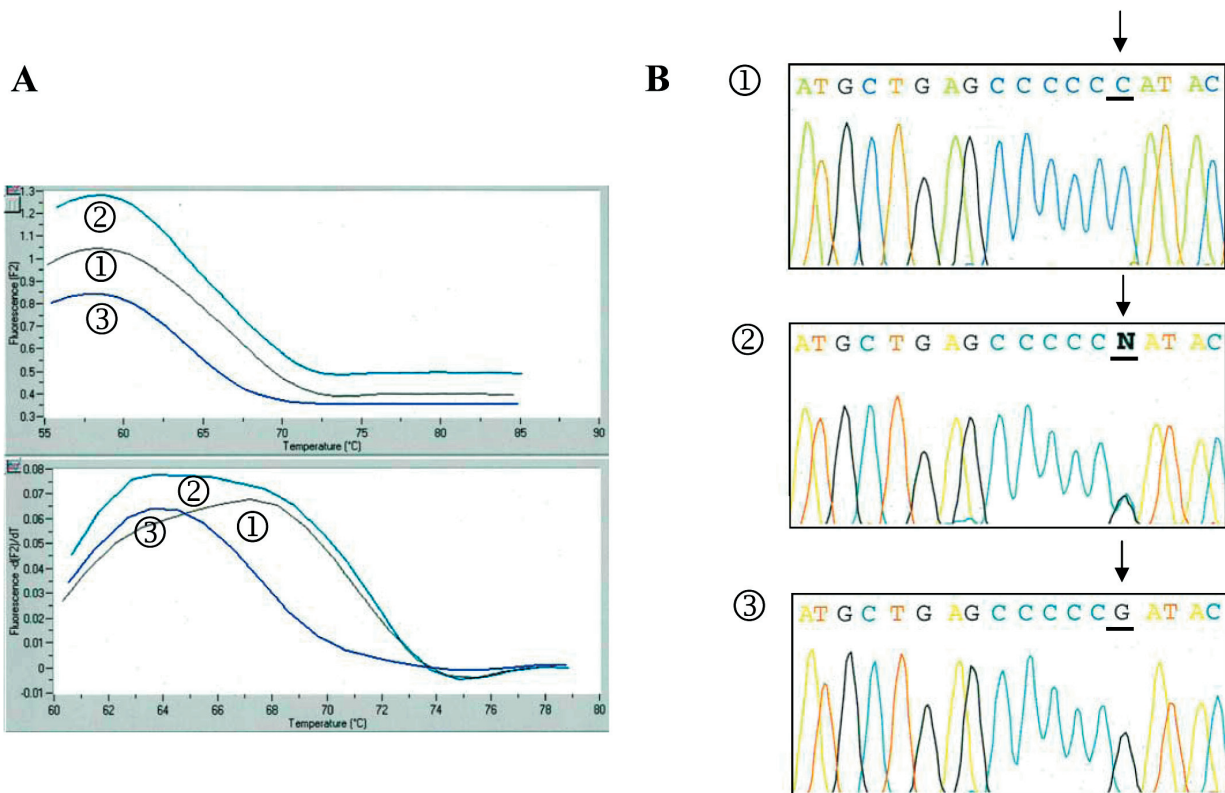


Abb. 3.13 A: Exemplarische Schmelzkurvenanalyse (LightCycler™), oben: abnehmendes Fluoreszenzsignals mit steigender Temperatur, unten: Darstellung der Schmelzgipfelmuster (①-③), B: zugehörige Nukleotidsequenzen.

3.3.2 Überprüfung auf Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Die Überprüfung auf das Hardy-Weinberg-Äquilibrium untersuchte, ob das Auftreten der SNP-Genotypen dem Auftreten in einer Idealpopulation ähnelte. In der Gesamtgruppe aller untersuchten Proben fand sich eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium, ebenso in den meisten Untergruppen. Nur die Untergruppen aller weiblichen Proben und der DCM-Patientengruppe wichen nicht vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium ab (Tab. 3.20).

Tab. 3.20 Genotyphäufigkeiten und Überprüfung auf Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Patientengruppen	Erwartete Genotyphäufigkeit nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz			Beobachtete Genotyphäufigkeit			Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium
	p_C^2 (erw. CC)	$2 \times p_C \times p_G$ (erw. CG)	p_G^2 (erw. GG)	CC	CG	GG	
alle Proben	0.015 (0.93)	0.212 (13.14)	0.773 (47.93)	4	7	51	ja ($p < 0.001$) $\chi^2 = 13.200$
Frauen	0.016 (0.32)	0.218 (4.36)	0.766 (15.32)	1	3	16	nein ($p > 0.05$) $\chi^2 = 1.899$
Männer	0.014 (0.59)	0.210 (8.82)	0.776 (32.59)	3	4	35	ja ($p < 0.001$) $\chi^2 = 12.657$
Kontrollen	0.021 (0.51)	0.249 (5.98)	0.730 (17.51)	2	3	19	ja ($p < 0.05$) $\chi^2 = 5.965$
AS	0.011 (0.16)	0.191 (2.68)	0.797 (11.16)	1	1	12	ja ($p < 0.05$) $\chi^2 = 5.526$
DCM	0.011 (0.26)	0.186 (4.48)	0.803 (19.26)	1	3	20	nein ($p > 0.05$) $\chi^2 = 2.624$

p_C : relative Häufigkeit des Allels C, p_G : relative Häufigkeit des Allels G, χ^2 : Testprüfgröße (hier signifikant ab einem Wert < 3.84). Übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

3.3.3 Genotyphäufigkeiten in allen myokardialen Proben

Vier von 62 untersuchten Proben zeigten den Genotyp C/C (6.4%), sieben den Genotyp C/G (11.3%) und 51 Proben den Genotyp G/G (82.3%). Somit wurde in den untersuchten Proben der Genotyp G/G als häufigster Genotyp gefunden (Tab. 3.20 und Abb. 3.14).

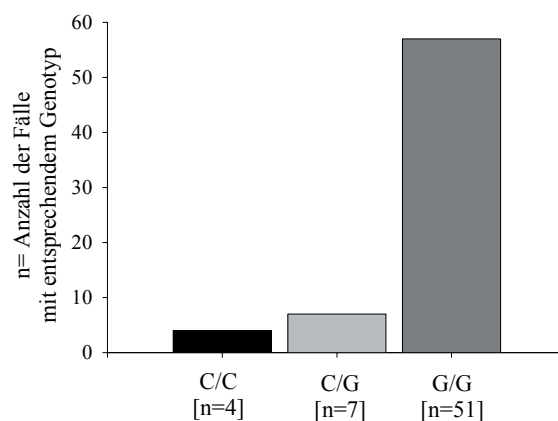


Abb. 3.14 Genotyphäufigkeiten in allen myokardialen Proben.

3.3.4 Allelfrequenz und Geschlecht

Die Allelfrequenz in allen untersuchten Proben betrug 0.121 für das C-Allel und 0.879 für das G-Allel. Die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen Frauen und Männern ($p=0.78$, Tab. 3.21).

Tab. 3.21 Allelfrequenzen aufgeteilt nach Geschlecht

Patientengruppen	Probenanzahl	Allelfrequenz [absolute Anzahl des Allels]	
		C-Allel	G-Allel
alle Proben	62	0.121 [15]	0.879 [109]
Frauen	20	0.125 [5]	0.875 [35]
Männer	42	0.119 [10]	0.881 [74]

3.3.5 Allelfrequenz und kardiovaskulärer Phänotyp

Die untersuchten Krankheitsgruppen unterschieden sich hinsichtlich der Allelfrequenz nicht von der Kontrollgruppe (Kontrollen vs. AS, $p=0.74$; Kontrollen vs. DCM, $p=0.76$, Tab. 3.22). Diese Analyse zeigte, dass in den untersuchten Gruppen keine Assoziation zwischen Allelfrequenz und kardialem Krankheitsbild bestand.

Tab. 3.22 Allelfrequenzen aufgeteilt nach Patientengruppen

Patientengruppen	Probenanzahl	Allelfrequenz [absolute Anzahl des Allels]	
		C-Allel	G-Allel
Kontrollen	24	0.146 [7]	0.854 [41]
AS	14	0.107 [3]	0.893 [25]
DCM	24	0.104 [5]	0.896 [43]

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

3.3.6 Genotyp und Expressionshöhe von ERalpha mRNA

Obwohl der untersuchte SNP die Aminosäuresequenz nicht veränderte, sollte untersucht werden, ob der Genotyp mit unterschiedlicher Expressionshöhe von ER alpha mRNA assoziiert ist. Auch eine Änderung der Sekundärstruktur der mRNA kann die Stabilität der mRNA und /oder die Ableserate verändern⁵⁶. Deshalb könnte auch ein SNP ohne Aminosäurenveränderung einen funktionellen Einfluß haben.

Es fand sich in keiner untersuchten Gruppe ein Anhalt für eine Assoziation zwischen dem ERalpha Genotyp und der jeweiligen Expressionshöhe von ERalpha mRNA (Tab. 3.23 und Abb. 3.15).

Tab. 3.23 Expressionshöhe von ERalpha /GAPDH in Abhängigkeit vom Genotyp

Patientengruppen	Probenanzahl	Mittelwerte ERalpha /GAPDH			Signifikanzniveau
		C/C – Genotyp	C/G - Genotyp	G/G – Genotyp	
Kontrolle	24	0.69 ± 0.25	0.94 ± 0.13	0.72 ± 0.07	p=0.34
AS	14	1.47 ± 0.00	1.63 ± 0.00	2.29 ± 0.76	p=0.99
DCM	24	0.87 ± 0.00	1.26 ± 0.42	1.35 ± 0.19	p=0.80

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

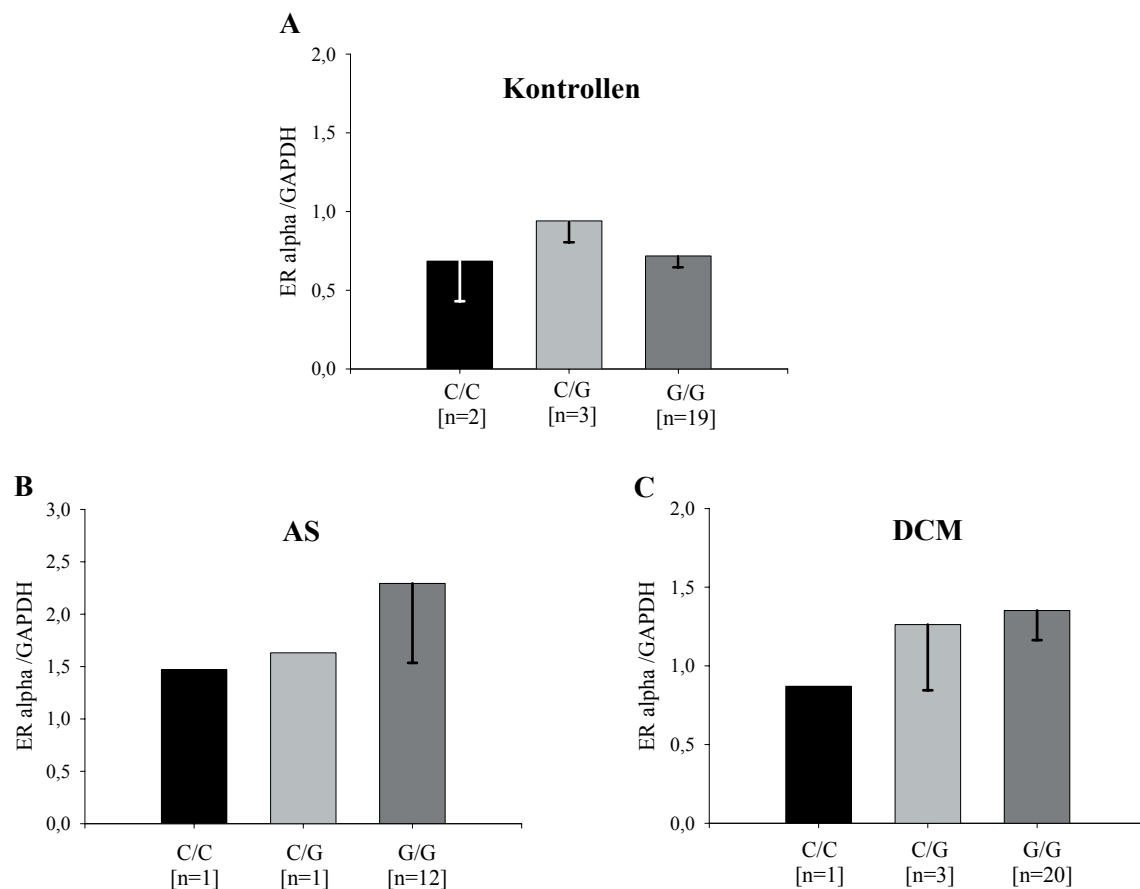


Abb. 3.15 Expressionshöhe von ERalpha / GAPDH in Abhängigkeit vom Genotyp. A: Darstellung in der Kontrollgruppe, B: Darstellung in der AS-Gruppe, C: Darstellung in der DCM-Gruppe.

3.4 Stimulation humaner, kardialer Fibroblasten mit 17beta-Estradiol

3.4.1 Konstanz des Referenzgens GAPDH

Das Referenzgen GAPDH wurde in menschlichen kardialen Fibroblasten sowohl nach 6h als auch nach 24h Stimulation mit 100nM 17beta-Estradiol nicht signifikant verändert (Tab. 3.24).

Tab. 3.24 GAPDH Fluoreszenzwerte

Patientengruppe	GAPDH Fluoreszenzwerte		Signifikanzniveau
	Kontrolle	100nM 17beta-Estradiol	
alle Patienten, 6h	5562± 736 [n=18]	5440±484 [n=19]	p=0.89
alle Patienten, 24h	7392±1507 [n=18]	5655±548 [n=18]	p=0.50

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

3.4.2 Effekte auf die Expression von ERalpha

Die Stimulation führte in den kardialen Fibroblasten der Patienten zu keinem einheitlichen Trend in der ERalpha Expression (Tab. 3.25 und 3.26), weshalb der Durchschnittswert aller Proben weder nach 6h (100% vs. 108±14%, p=0.69) noch nach 24h (100% vs. 114±7%, p=0.09) verändert war.

Tab. 3.25 ERalpha / GAPDH nach 6h Stimulation mit 100nM 17beta-Estradiol

Patienten	Sex	Alter	VAD	ERalpha / GAPDH in % des Mittelwertes der Kontrollen	
				Kontrollen, 6h	17beta-Estradiol, 6h
Pat. 1, DCM	W	14	-	100 ± 13 [n=3]	095 ± 28 [n=3]
Pat. 2, DCM	M	33	DeBakey	100 ± 21 [n=3]	138 ± 16 [n=4]
Pat. 3, DCM	M	57	DeBakey	100 ± 06 [n=3]	118 ± 02 [n=3]
Pat. 4, DCM	M	60	-	100 ± 09 [n=3]	104 ± 12 [n=3]
Pat. 5, ICM	M	57	-	100 ± 19 [n=3]	048 ± 14 [n=3]
Pat. 6, rKMP	M	32	-	100 ± 11 [n=3]	145 ± 18 [n=3]

Tab. 3.26 ERalpha / GAPDH nach 24h Stimulation mit 100nM 17beta-Estradiol

Patienten	Sex	Alter	VAD	ERalpha / GAPDH in % des Mittelwertes der Kontrollen	
				Kontrollen, 24h	17beta-Estradiol, 24h
Pat. 1, DCM	W	14	-	100 ± 15 [n=3]	101 ± 04 [n=2]
Pat. 2, DCM	M	33	DeBakey	100 ± 43 [n=3]	105 ± 48 [n=4]
Pat. 3, DCM	M	57	DeBakey	100 ± 01 [n=3]	097 ± 07 [n=3]
Pat. 4, DCM	M	60	-	100 ± 07 [n=3]	121 ± 26 [n=3]
Pat. 5, ICM	M	57	-	100 ± 33 [n=3]	142 ± 34 [n=3]
Pat. 6, rKMP	M	32	-	100 ± 18 [n=3]	117 ± 16 [n=3]

+ Therapie eingesetzt, - Therapie nicht eingesetzt. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

3.4.3 Effekte auf die Expression von Endothelin-1 (ET-1)

Die Stimulation führte in den kardialen Fibroblasten der Patienten zu keinem einheitlichen Trend in der ET-1 Expression (Tab. 3.27 und 3.28), weshalb der Durchschnittswert aller Proben weder nach 6h (100% vs. $113 \pm 14\%$, $p=0.31$) noch nach 24h (100% vs. $105 \pm 6\%$, $p=0.56$) verändert war.

Tab. 3.27 ET-1 / GAPDH nach 6h Stimulation mit 100nM 17beta-Estradiol

Patienten	Sex	Alter	VAD	Endothelin-1 / GAPDH in % des Mittelwertes der Kontrollen	
				Kontrollen, 6h	17beta-Estradiol, 6h
Pat. 1, DCM	W	14	-	100 ± 11 [n=3]	105 ± 14 [n=3]
Pat. 2, DCM	M	33	DeBakey	100 ± 05 [n=3]	124 ± 09 [n=4]
Pat. 3, DCM	M	57	DeBakey	100 ± 04 [n=3]	141 ± 10 [n=3]
Pat. 4, DCM	M	60	-	100 ± 07 [n=3]	104 ± 06 [n=3]
Pat. 5, ICM	M	57	-	100 ± 13 [n=3]	055 ± 12 [n=3]
Pat. 6, rKMP	M	32	-	100 ± 06 [n=3]	149 ± 19 [n=3]

Tab. 3.28 ET-1 / GAPDH nach 24h Stimulation mit 100nM 17beta-Estradiol

Patienten	Sex	Alter	VAD	Endothelin-1 / GAPDH in % des Mittelwertes der Kontrollen	
				Kontrollen, 24h	17beta-Estradiol, 24h
Pat. 1, DCM	W	14	-	100 ± 02 [n=3]	108 ± 02 [n=2]
Pat. 2, DCM	M	33	DeBakey	100 ± 26 [n=3]	096 ± 14 [n=4]
Pat. 3, DCM	M	57	DeBakey	100 ± 11 [n=3]	126 ± 01 [n=3]
Pat. 4, DCM	M	60	-	100 ± 07 [n=3]	099 ± 21 [n=3]
Pat. 5, ICM	M	57	-	100 ± 24 [n=3]	126 ± 33 [n=3]
Pat. 6, rKMP	M	32	-	100 ± 24 [n=3]	085 ± 15 [n=3]

+ Therapie eingesetzt, - Therapie nicht eingesetzt. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

3.4.4 Effekte auf die Expression von ET_A-Rezeptor

Die Stimulation führte in den kardialen Fibroblasten der Patienten zu keinem einheitlichen Trend in der ET_A-Rezeptor Expression (Tab. 3.29 und 3.30), weshalb der Durchschnittswert aller Proben weder nach 6h (100% vs. 111±7%, p=0.22) noch nach 24h (100% vs. 100±9%, p=0.99) verändert war.

Tab. 3.29 ET_A-Rezeptor / GAPDH nach 6h Stimulation mit 100nM 17beta-Estradiol

Patienten	Sex	Alter	VAD	ET(A)-R / GAPDH in % des Mittelwertes der Kontrollen	
				Kontrollen, 6h	17beta-Estradiol, 6h
Pat. 1, DCM	W	14	-	100 ± 23 [n=3]	115 ± 71 [n=3]
Pat. 2, DCM	M	33	DeBakey	100 ± 29 [n=3]	132 ± 29 [n=4]
Pat. 3, DCM	M	57	DeBakey	100 ± 03 [n=3]	107 ± 05 [n=3]
Pat. 4, DCM	M	60	-	100 ± 13 [n=3]	090 ± 12 [n=3]
Pat. 5, ICM	M	57	-	100 ± 21 [n=3]	093 ± 17 [n=3]
Pat. 6, rKMP	M	32	-	100 ± 25 [n=3]	126 ± 16 [n=3]

Tab. 3.30 ET_A-Rezeptor / GAPDH nach 24h Stimulation mit 100nM 17beta-Estradiol

Patienten	Sex	Alter	VAD	ET(A)-R / GAPDH in % des Mittelwertes der Kontrollen	
				Kontrollen, 24h	17beta-Estradiol, 24h
Pat. 1, DCM	W	14	-	100 ± 16 [n=3]	127 ± 30 [n=2]
Pat. 2, DCM	M	33	DeBakey	100 ± 24 [n=3]	077 ± 17 [n=4]
Pat. 3, DCM	M	57	DeBakey	100 ± 16 [n=3]	126 ± 17 [n=3]
Pat. 4, DCM	M	60	-	100 ± 12 [n=3]	075 ± 04 [n=3]
Pat. 5, ICM	M	57	-	100 ± 18 [n=3]	094 ± 04 [n=3]
Pat. 6, rKMP	M	32	-	100 ± 08 [n=3]	098 ± 12 [n=3]

+ Therapie eingesetzt, - Therapie nicht eingesetzt. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts.

3.4.5 Korrelationen der Stimulationseffekte nach 6h

Nach 6h Stimulation wurde eine positive Korrelation zwischen den Stimulationseffekten auf die Expression von ERalpha und ET-1 gefunden ($r=0.94$, $p<0.01$, Tab. 3.31 und Abb. 3.16). Sonst wurden keine weitere signifikante Korrelationen gefunden (Tab. 3.31).

Tab. 3.31 Korrelationen der Stimulationseffekte nach 6h

	Korrelationen nach 6h Stimulation mit 17beta-Estradiol	
	ERalpha /GAPDH	ET-1 /GAPDH
ET-1 /GAPDH	$r= 0.94$, $p<0.01$	-
ET(A)-R /GAPDH	$r=0.75$, $p=0.08$	$r=0.64$, $p=0.17$

Fettgedruckt: signifikanter Wert. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

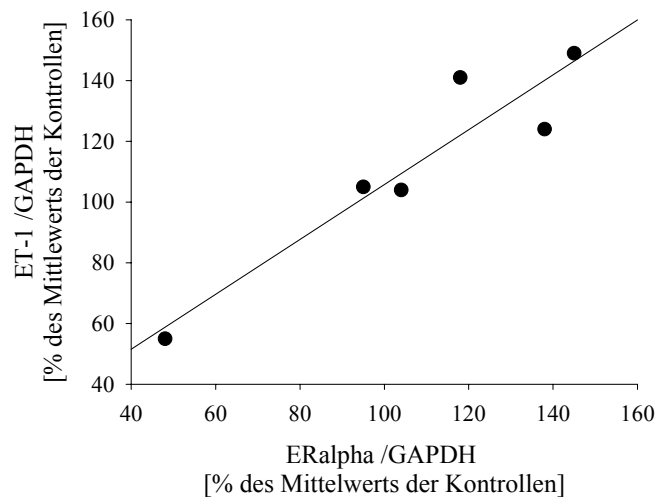


Abb. 3.16 Korrelation zwischen ERalpha /GAPDH und ET-1 /GAPDH nach 6h Stimulation.

3.4.6 Korrelationen der Stimulationseffekte nach 24h

Nach 24h Stimulation wurden keine signifikante Korrelationen zwischen den Stimulationseffekten auf die Expression von ERalpha, ET-1 oder ET_A-Rezeptor gefunden (Tab. 3.32).

Tab. 3.32 Korrelationen der Stimulationseffekte nach 24h

	Korrelationen nach 24h Stimulation mit 17beta-Estradiol	
	ERalpha /GAPDH	ET-1 /GAPDH
ET-1 /GAPDH	$r= 0.13$, $p=0.81$	-
ET(A)-R /GAPDH	$r=-0.49$, $p=0.32$	$r=0.48$, $p=0.34$

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 5).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Krankheitsabhängigkeit in der Regulation von myokardialen ER beim Menschen beschrieben^{57,58} und ein Zusammenhang zur Funktion bei linksventrikulärer Hypertrophie⁵⁷ und Herzinsuffizienz⁵⁸ hergestellt.

In Myokardproben von Patienten mit Aortenklappenstenose waren ERalpha- und ERbeta-mRNA (Abb. 4.1), sowie ERalpha-Protein heraufreguliert. Dabei konnte dem Subtyp ERbeta eine besondere Funktion zugeordnet werden, denn es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen den Transkriptmengen von ERbeta und den Transkriptmengen der Calcineurin-Isoformen CnA beta und CnB. Weiterhin war der prozentuale Anstieg der ERbeta-Erhöhung in der Gruppe der Frauen doppelt so hoch wie bei den Männern (Abb. 4.1). Bei dilatativer Kardiomyopathie (DCM) konnte dem Subtyp ERalpha eine hervorgehobene Funktion zugeordnet werden, denn es waren ERalpha-mRNA und -Protein heraufreguliert, nicht aber ERbeta-mRNA (Abb. 4.1). Hingegen wurde für einen SNP in Exon 4 des für ERalpha kodierenden Gens kein Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung gefunden. Es zeigte sich keine Assoziation zum kardialen Phänotyp oder vorliegender ERalpha mRNA-Menge. Schließlich fanden sich in humanen kardialen Fibroblasten aus insuffizienten Herzen Hinweise darauf, dass 17beta-Estradiol die Genexpression von ET-1 und ET_A-Rezeptor individuell beeinflussen kann.

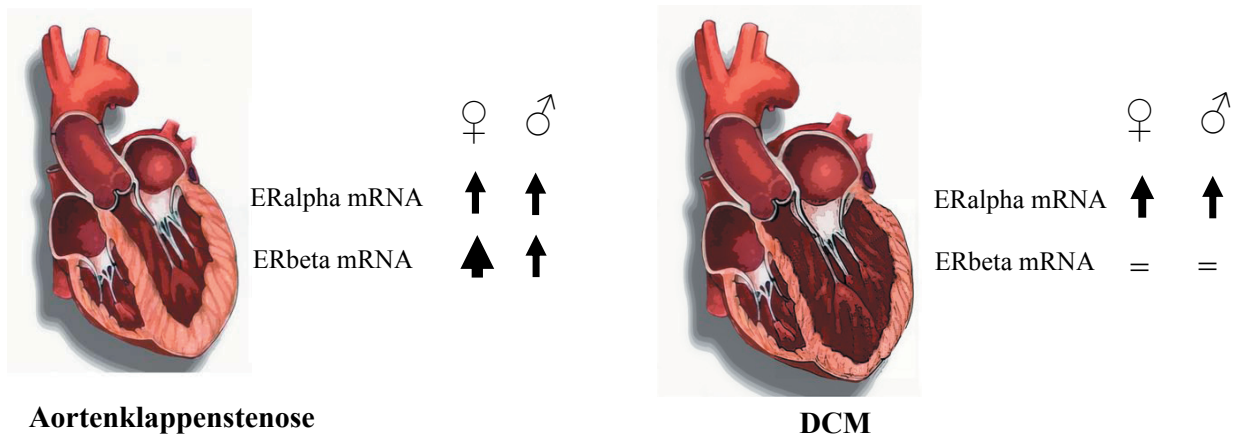


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der ERmRNA-Regulation bei Aortenklappenstenose und dilatativer Kardiomyopathie (DCM), aufgetrennt nach Geschlecht. (Bilder nach www.metrohealth.org).

Beide ER konnten in allen untersuchten Myokardproben nachgewiesen werden, was Befunde aus Studien mit Herzen von Ratten und Menschen unterstützt^{1,2,59}. Die Lokalisation von ERalpha im humanen Myokard wurde in einer Publikation beschrieben⁵⁸, in der auch Teile der vorliegenden Arbeit enthalten sind. In gesunden Herzen war ERalpha im Cytoplasma, in den Glanzstreifen und im Zellkern lokalisierbar⁵⁸ - ähnlich Befunden aus Studien mit Herzmuskelzellen aus Ratten⁶⁰. Hingegen war ERalpha in Myokardproben von Patienten mit DCM nicht mehr in den Glanzstreifen vorhanden⁵⁸, was zu struktureller Instabilität und gestörter kardialer Kontraktilität beitragen könnte.

4.1 ER bei linksventrikulärer Hypertrophie durch Aortenklappenstenose

Es konnte gezeigt werden, dass beide Östrogenrezeptoren (ER) in linksventrikulären Myokardproben von Patienten mit AS heraufreguliert wurden. Die vorliegende Arbeit liefert damit erstmals Hinweise auf eine Rolle von ER bei linksventrikulärer Hypertrophie im menschlichen Herzen. In Tiermodellen wurden bereits protektive Wirkungen für beide ER gefunden. Die spezifische Anregung von ERalpha verhinderte die Ausbildung kardialer Hypertrophie in spontan-hypertensiven Ratten⁶¹ und ERbeta verhinderte kardiale Hypertrophie in Mäusen nach experimenteller Aortenstenose⁶².

Bei der Untersuchung von molekularen Mechanismen kardialer Hypertrophie nimmt das Ca²⁺-Ion eine Schlüsselposition ein. Viele bekannte Vermittler kardialer Hypertrophie, wie das adrenerge System oder das Renin-Angiotensin-System (RAS), erhöhen den intrazellulären Ca²⁺-Gehalt von Herzmuskelzellen⁶³⁻⁶⁵. Dies aktiviert über die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin den Hypertrophie-fördernden Transkriptionsfaktor NFAT⁶⁶⁻⁶⁹. Calcineurin ist ein Heterotrimer aus einer katalytischen Einheit A (CnA) und einer regulatorischen Einheit B (CnB), sowie dem Ca²⁺-bindenden Protein Calmodulin⁷⁰. Für die Hypertrophie-fördernden Effekte scheint die Isoform CnA beta besonders wichtig zu sein, denn deren isolierte Gen-Deletion verhinderte die Ausprägung kardialer Hypertrophie in einem transgenen Mausmodell⁷¹.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine negative Korrelation zwischen den Transkriptmengen von ERbeta und den Transkriptmengen der Calcineurin-Isoformen CnA beta und CnB. Daraus lässt sich eine mögliche Verbindung zwischen dem Anstieg in der ERbeta mRNA und einer Unterdrückung von Calcineurin mRNA herstellen. Dies könnte entweder eine entgegengesetzte Regulation dieser Moleküle durch unabhängige Faktoren, wie Peptid-Wachstumshormone^{72,73}, oder eine direkte Interaktion anzeigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Unterscheidung nicht getroffen werden. Falls eine direkte molekulare Verbindung bestünde, könnte die Verringerung der Hypertrophie-fördernden Calcineurin-Effekte eine vorteilhafte Wirkung von ERbeta darstellen. Ein Hinweis darauf fand sich in isolierten Herzmuskelzellen von Ratten, wo 17beta-Estradiol über die Gen-Induktion von MCIP-1 die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin und die NFAT-abhängige Transkription reduzierte⁷⁴.

Ergebnisse aus klinischen Studien ließen eine Interaktion zwischen ER und BNP vermuten, denn die Einnahme von HT erhöhte den BNP-Plasma-Spiegel^{21,22}. Weiterhin scheint bei Frauen der basale BNP-Spiegel höher zu sein als bei Männern⁷⁵. BNP gilt als Hypertrophie-hemmend^{18,19}, da es die kardiale Vor- und Nachlast senkt und auch auf molekularer Ebene die Hypertrophie-Entwicklung einschränkt⁷⁶. Eine Korrelationsanalyse zwischen ER- und BNP-Transkriptmengen zeigte aber keine Assoziation, weshalb eine direkte Verbindung zwischen der Regulation der Gen-Expression von ER and BNP unwahrscheinlich ist.

ERbeta - Geschlechterunterschied in der Vermittlung kardialer Hypertrophie

Der prozentuale Anstieg der ERbeta-Erhöhung war in der Gruppe der Frauen doppelt so hoch wie bei den Männern. Weiterhin ist die enge negative Korrelation zwischen der Menge an ERbeta mRNA und der LVEF in der Gesamtgruppe auf die Frauen zurückzuführen. Das könnte bei der geringen Fallzahl und möglichen Ausreißer-Werten statistisch zufällig sein, aber auch ein Hinweis auf Geschlechterunterschiede bei der Kompensation linksventrikulärer Hypertrophie sein. Dies würde mit klinischen Befunden übereinstimmen, in welchen Frauen mit AS bei ähnlicher Druckbelastung des linken Ventrikels eine bessere Herzfunktion zeigten¹³. Wenn man in diesem Kontext vorteilhafte Wirkungen von ERbeta annimmt, scheinen Frauen eine erhöhte kompensatorische Reserve bei linksventrikulärer Hypertrophie zu besitzen.

Diese These wird durch einen Befund aus einem experimentellen Tiermodell für Aortenstenose (TAC) gestützt⁷⁷. In dieser Studie wurde zunächst eine Deletion von ERbeta (BERKO) in Mäusen durchgeführt. Nach TAC wiesen die weiblichen BERKO-Mäuse eine verstärkte Hypertrophie gegenüber den Wildtyp-Tieren auf. Bei den männlichen BERKO-Mäusen wurde dieser Unterschied hingegen nicht gefunden⁷⁷. Daraus folgerten die Autoren, dass ERbeta für den Geschlechterunterschied in der Vermittlung kardialer Hypertrophie verantwortlich sei. Die Arbeitsgruppe Regitz-Zagrosek, der auch der Autor dieser Dissertation angehörte, konnte diesen Befund in BERKO Tieren bestätigen (Schubert et al., unpubliziert).

Der Befund scheint einen Geschlechterunterschied widerzuspiegeln und nicht einen Unterschied im Östrogen-Plasmaspiegel, denn die gemessenen ERbeta Werte der beiden Patientinnen mit HT lagen im Bereich des Mittelwerts der gesamten Gruppe der AS-Patientinnen. Dies ist deshalb bedeutsam, da die Aortenklappenstenose eher eine Erkrankung des älteren Menschen darstellt⁷⁸ und bei Frauen meist erst nach der Menopause auftritt.

4.2 ER bei Herzinsuffizienz

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Heraufregulation von ERalpha in linksventrikulären Myokardproben von Patienten mit DCM beschrieben. ERbeta wurde in diesem Zusammenhang nicht reguliert, was sich von den Befunden bei AS unterscheidet. Dies könnte darauf hinweisen, dass ER bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz verschieden reguliert werden und ERalpha dabei eine herausgehobene physiologische Bedeutung hat.

Zusätzlich zu seiner Funktion als Transkriptionsfaktor kann ERalpha auch mit cytoplasmatischen Proteinen interagieren⁷⁹. Deshalb könnte ERalpha zwei wichtige Mechanismen in der Progression von Herzinsuffizienz vorteilhaft beeinflussen: den Untergang von Herzmuskelzellen durch Apoptose⁸⁰⁻⁸² sowie die gestörte Zell-Zell-Interaktion⁸³. Ein indirekter Hinweis auf vorteilhafte ER-Wirkungen ergibt sich aus einer Tierstudie, in der die Gabe von 17beta-Estradiol die Überlebensrate männlicher Mäuse erhöhte, welche zuvor eine DCM nach Überexpression von TNF-alpha entwickelt hatten⁸⁴. In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte eine Reduktion der myokardialen Apoptoserate nach Ischämie-Stress über einen ERalpha-PI3-kinase-Akt-abhängigen Signalweg gezeigt werden⁷⁹. Eine Erhöhung von ERalpha in DCM könnte einen kompensatorischen Versuch darstellen, die Apoptoserate zu verringern und somit die Progression der Herzinsuffizienz zu verlangsamen.

Eine DCM kann durch eine Vielzahl von Ursachen ausgelöst werden und ist durch eine Dilatation des linken Ventrikels oder beider Ventrikel gekennzeichnet⁸⁵. Dies führt zu einer gestörten Zell-Zell-Interaktion an den „gap junctions“^{83,86}, welche der chemischen und elektrischen Kopplung von Herzmuskelzellen dienen⁸⁷. In diesem Zusammenhang spielt Connexin43 (Cx43)⁸⁸ eine wichtige Rolle, da es das vorherrschende Protein der „gap junctions“ darstellt. Cx43 wird bei DCM zusammen mit anderen Molekülen der Connexin-Gruppe herunterreguliert⁸⁹, was zu einer verminderten kontraktile Funktion des Myokards und erhöhter Arrhythmie-Neigung führen kann^{89,90}. Eine Heraufregulation von ERalpha bei DCM könnte als Versuch einer Kompensation interpretiert werden, denn die Gabe von 17beta-Estradiol aktivierte Cx43 über einen ER-abhängigen Mechanismus⁹¹. Weiterhin könnte ERalpha die Cx43-Expression erhöhen, denn in einer Studie mit HeLa-Zellen erhöhte „Ini“ - ein kleines nukleäres Protein - die Responsivität des Cx43 Promotors spezifisch gegenüber ERalpha⁹². Zwar konnte in einer Publikation, in der auch Teile der vorliegenden Arbeit enthalten sind, ERalpha mit Cx43 im menschlichen Myokard nicht kolokalisiert werden⁵⁸, eine mögliche Verbindung dieser beiden Moleküle, auch unter Miteinbeziehung anderer Proteine, ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Kein Geschlechterunterschied in der ER-Regulation bei DCM

Die Regulation der ER bei DCM schien keinen Geschlechterunterschied aufzuweisen. Allerdings kann keine statistische Aussage darüber getroffen werden, da nur drei von 37 untersuchten Myokardproben von weiblichen DCM-Patienten stammten. Die ungleiche Verteilung ist zum einen Ausdruck der

Limitation in der Verfügbarkeit von menschlichen Myokardproben, könnte aber auch Ausdruck einer möglicherweise geringeren Prävalenz von DCM bei Frauen sein^{93,94}.

4.3 ER in Spenderherzen

In Spenderherzen war die Expressionshöhe beider ER unabhängig vom Alter. Es wurde aber ein Geschlechterunterschied in der Expressionshöhe von ERbeta gefunden, denn die Männer wiesen doppelt so hohe Werte auf als die Frauen. Effekte des Serum-Östrogen-Spiegels scheinen dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Für diese These spricht, dass sich die ER-Expression zwischen postmenopausalen Frauen und gleichaltrigen Männern unterschied, obwohl nach allgemeinen Befunden davon ausgegangen werden kann, dass die Serum-Östrogen-Spiegel in beiden Gruppen ähnlich niedrig sind (5-20 pg/ml)³. Einschränkend muss erwähnt werden, dass aufgrund begrenzter klinischer Angaben über die Organspender ein möglicher Einfluss von Hormontherapie (HT) auf die ER-Expression in der vorliegenden Arbeit nicht diskutiert werden kann. Weiterhin konnten Effekte von kurzfristigen Änderungen des Serum-Östrogen-Spiegels nicht erfasst werden, da die vorliegende Untersuchung als Querschnitts-Studie durchgeführt wurde. In einer Zellkulturstudie mit Endothelzellen von Schafen führte bspw. eine 6-stündige Stimulation mit 17beta-Estradiol zu einer Veränderung der ER-Expression, welche aber nach 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen war⁹⁵.

In der Literatur findet sich nur eine Arbeit, die den Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Expressionshöhe von ER im Myokard von Sprague-Dawley Ratten untersuchte⁵⁹. Darin wurden allerdings neonatale (4 Tage alte) und adulte (55 Tage alte) Ratten miteinander verglichen und nicht adulte Tiere unterschiedlichen Alters⁵⁹. In dieser Studie wurde eine Abhängigkeit der ER-Expression vom Alter gefunden, nicht aber vom Geschlecht⁵⁹. Im linken Ventrikel zeigte ERalpha mit zunehmendem Alter eine erhöhte und ERbeta eine geringere Expression⁵⁹. Die Autoren interpretierten dies als Expressions-Dynamik im Zuge der Entwicklung vom neonatalen zum adulten Herzen⁵⁹. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde ein Geschlechterunterschied bei der ER-Expression gefunden, der unabhängig vom Alter bei adulten Menschen war.

Unterschiede in der ER-Subtypverteilung könnten Auswirkungen auf die ER-Signaltransduktion haben, denn die Molekularstruktur der beiden ER unterscheidet sich in den aktivierenden Domänen 1 und 2³, an welchen die ER mit Liganden und Cofaktoren interagieren^{8,9}. Außerdem wurde gezeigt, dass beide ER unabhängige Wirkungen voneinander erzielen können⁹⁶. So aktivierte bevorzugt ERbeta die Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase in Herzmuskelzellen von Ratten⁹⁷. Bisher konnte jedoch noch keine selektive Zuordnung von ER zu spezifischen Signaltransduktionswegen vorgenommen werden. Durch die Verwendung von ER-Deletionen in Tiermodellen und den Einsatz selektiver ER-Modulatoren (SERMs) finden sich aber in der Literatur gehäuft Hinweise auf spezifische Wirkungen der beiden ER^{61,77}.

4.4 ERalpha-SNP und kardialer Phänotyp

Ein in der Literatur bereits bekannter SNP^{40,98-100} in Exon 4 des für ERalpha kodierenden Gens wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden und betraf die dritte Basenposition des Nukleinsäuretripletts von Kodon 325 (rs1801132). In den hier untersuchten Proben war G/G der am häufigsten vorkommende Genotyp. Für diesen SNP hat das „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“ Sequenzanalysen von 359 Individuen zum Vergleich zusammengestellt. Darin wird C/C als häufigster Genotyp ausgewiesen. Aufgrund der insgesamt geringen Probenanzahl der Sammlung und aufgrund möglicher ethnischer Unterschiede der untersuchten Individuen kann man anhand dieser Ergebnisse nicht abschließend feststellen, welcher Genotyp in der Gesamtbevölkerung am häufigsten vorliegt.

Von besonderer Bedeutung wäre diese Information, wenn der vorliegende ERalpha-Genotyp mit einem kardialen Phänotyp assoziiert werden könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine Assoziation zwischen Allelfrequenz und Geschlecht oder beobachtetem kardialen Phänotyp gesehen. In einer Analyse der Framingham-Studie, einer systematischen Untersuchung von Ursachen und Risiken der Koronaren Herzkrankheit, wurde dieser SNP bei Männern mit dem Körpermassen-Index (BMI) assoziiert⁴⁰. Auch Arbeiten aus anderen medizinischen Fachbereichen fanden Assoziationen zwischen diesem SNP und Phänotypen⁹⁸⁻¹⁰⁰, obwohl alle Genotyp-Varianten die gleiche Aminosäure (Prolin) kodieren.

Eine mögliche Funktion von SNPs an dritter Basenposition, die keine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken, konnte in Studien gezeigt werden, die deren Einfluss auf die Stabilität der mRNA^{56,101} und die Regulation der mRNA-Expression nachwiesen⁵⁶. In dieser Arbeit fand sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Genotyp und vorliegender ERalpha mRNA-Menge, auch nicht nach Aufteilung in Krankheitsgruppen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Stichproben-Anzahl zu klein war, um statistische Unterschiede sicher erfassen zu können. Weiterhin zeigen Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium in den untersuchten Gruppen an, dass die vorgenommenen Untersuchungen nur als Pilotstudien für weitere Arbeiten betrachtet werden können.

Ausgehend von den Daten dieser Pilotstudien scheint der untersuchte SNP in Exon 4 von ERalpha kein Kandidat für die Erklärung von Geschlechterunterschieden im Phänotyp von kardialer Hypertrophie oder Herzinsuffizienz zu sein. Dies fügt der quantitativen ERalpha-Analyse, die ebenfalls keinen Geschlechterunterschied zeigte, einen weiteren Befund hinzu.

4.5 17beta-Estradiol und Endothelin - „Achse“

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals humane kardiale Fibroblasten aus insuffizienten Herzen mit 17beta-Estradiol stimuliert, um dessen Einfluss auf die Expression von Endothelin-1 (ET-1) und seinem ET_A-Rezeptor zu überprüfen.

Vorbefunde aus Experimenten mit kardialen Fibroblasten aus Ratten⁴⁹ sowie humanen und bovinen Endothelzellen^{102,103} ließen eine einheitliche Herabregulation der ET-1 Genexpression nach Stimulation mit 17beta-Estradiol erwarten. Die humanen kardialen Fibroblasten zeigten jedoch ein uneinheitliches Muster. Beispielsweise war bei beiden Patienten, die zuvor eine ventrikuläre Herzunterstützungspumpe (VAD) implantiert bekommen hatten, ET-1 nach 6h Stimulation leicht heraufreguliert und nach 24h wieder verringert. Hingegen wurde gar keine Veränderung der ET-1 Genexpression bei den Patienten ohne vorherige VAD-Implantation gesehen.

Der untersuchte Zelltyp und die zugrundeliegenden Krankheitsbilder könnten die Stimulierbarkeit der ET-1 Genexpression durch 17beta-Estradiol beeinflussen. Weiterhin könnte die VAD-Therapie die Stimulierbarkeit der ET-1 Genexpression verändern, denn in einer Studie reduzierte die VAD-Therapie in herzinsuffizienten Patienten den Plasmaspiegel von systemisch zirkulierendem ET-1¹⁰⁴. Interessanterweise zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der gemessenen ERalpha- und ET-1-Genexpression nach 6h. Dies könnte darauf hinweisen, dass beide Gene kurzfristig durch einen unabhängigen molekularen Mechanismus reguliert werden oder dass eine direkte molekulare Interaktion zwischen beiden Genen stattgefunden hat.

Während extern zugeführtes ET-1 als Fibrose-fördernd beschrieben wurde⁴⁷, ist die funktionelle Bedeutung von parakrinem/autokrinem ET-1 innerhalb des kardialen Remodeling noch weitgehend unbekannt. In einem transgenen Tiermodell mit spezifischer Deletion von ET-1 in Herzmuskelzellen wurde parakrin sezerniertes ET-1 als Fibrose-hemmend beschrieben, was sich nach 10 Monaten in einer histologischen Untersuchung zeigte¹⁰⁵.

Im Vergleich zu seinem Liganden ET-1 fiel die Veränderung in der Genexpression von ET_A-Rezeptor prozentual geringer aus. Befunde aus Experimenten mit anderen Zelltypen¹⁰⁶ ließen eine einheitliche Regulation von ET_A-Rezeptor erwarten. In der vorliegenden Arbeit hingegen wies die Regulation von ET_A-Rezeptor keinen einheitlichen Trend auf. Eine Korrelationsanalyse zwischen ET-1 und ET_A-Rezeptor ergab keinen signifikanten Befund. Ein koordinierter Einfluss von 17beta-Estradiol auf beide Komponenten der untersuchten ET-1/ET_A-Rezeptor „Achse“ scheint daher unwahrscheinlich.

4.6 Limitationen der experimentellen Arbeit

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich humane Myokardproben verwendet wurden, ergaben sich durch das verfügbare Material Limitationen. Daher konnten nicht alle Untersuchungen in allen Proben durchgeführt werden und ausgewogene Untergruppen nicht immer gewährleistet werden. Dies war vor allem der Fall bei der Untersuchung der DCM-Patienten, wo keine statistische Aussage über mögliche Geschlechterunterschiede in der ER-Expression getroffen werden konnte. Weiterhin muss bei der SNP-Analyse erneut kritisch auf die Probenanzahl hingewiesen werden.

Die Verwendung von HT konnte bei den Organspenderinnen nur in Einzelfällen eruiert werden. Aussagen über den Einfluss von HT auf die ER-Expression im linksventrikulären Myokard konnten nur begrenzt getroffen werden. Dazu wurden die Werte der HT-Nutzerinnen mit den Mittelwerten der Gesamtgruppe verglichen. Dies ermöglichte allerdings nur eine grobe Abschätzung.

Die verwendeten Techniken wie realtime RT-PCR und Western-Blot sind etablierte Verfahren, besitzen aber Limitationen im Auflösungsvermögen von Unterschieden. Die hier detektierten Unterschiede in den Myokardproben waren jedoch so groß, dass dieser Punkt nur eine geringe Limitation dieser Arbeit darstellt. Weiterhin zeigten die Doppelansätze akzeptable Variationskoeffizienten (9-11% für realtime RT-PCR und 5-7% für Western-Blot), sodass die gefundenen Unterschiede die Streubreite der verwendeten Verfahren übertraf.

Bei der Untersuchung der kardialen Fibroblasten waren die Mehrfachansätze breit gestreut, sodass nur begrenzte Aussagen möglich waren. Weiterhin wurde nicht geprüft, ob 17beta-Estradiol seine Wirkungen über ERs erzielte. Der Einsatz von selektiven ER-Modulatoren (SERMs) könnte dies zwar untersuchen, allerdings ist der Einsatz der bisher verwendeten Substanzen ICI 182, 780 und Tamoxifen insofern problematisch, als sie in einer Studie auch unabhängig von der ER-Modulation eigene Wirkungen auf das kardiale Zellwachstum ausüben konnten¹⁰⁷.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt, ob sich die detektierten Unterschiede in der ERbeta mRNA auch in der Höhe der ERbeta-Proteinmenge widerspiegeln. Dies könnte in einer Western-Blot-Analyse weiter untersucht werden.

4.7 Zusammenfassung

Immer häufiger werden bei Untersuchungen von Herz-Kreislaufkrankungen Geschlechterunterschiede gefunden, so auch in klinischen und tierexperimentellen Studien zu linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Östrogenrezeptoren (ER) gehörten in tierexperimentellen Studien zu den interessantesten Kandidaten, die zu diesen Befunden beitragen konnten. In der vorliegenden Arbeit wurden nun erstmals Hinweise auf deren Bedeutung in menschlichen Herzen gefunden.

Es konnte gezeigt werden, dass beide ER in linksventrikulären Myokardproben von Patienten mit Aortenklappenstenose heraufreguliert wurden (mRNA: ERalpha 3.0-fach und ERbeta 2.6-fach, jeweils $p < 0.001$; Protein: ERalpha 1.5-fach, $p < 0.05$). ERbeta schien dabei eine besondere Bedeutung zu haben, denn es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen den Transkriptmengen von ERbeta und den Transkriptmengen der Calcineurin-Isoformen CnA beta ($r = -0.89$, $p < 0.001$) und CnB ($r = -0.88$, $p < 0.001$), welche als Hypertrophie-fördernd gelten. Falls eine direkte Verbindung zwischen diesen Molekülen bestünde, könnte die Verringerung der Hypertrophie-fördernden Calcineurin-Effekte eine vorteilhafte Wirkung von ERbeta darstellen. Weiterhin scheint ERbeta ein Kandidat für den Geschlechterunterschied in der Kompensation kardialer Hypertrophie zu sein, denn der prozentuale Anstieg der ERbeta-Erhöhung war in der Gruppe der Frauen doppelt so hoch wie bei den Männern (433% vs. 190%, $p < 0.01$), und es fand sich eine negative Korrelation zwischen der Menge an ERbeta mRNA und der LVEF nur bei Frauen ($r = -0.99$, $p < 0.001$).

Bei dilatativer Kardiomyopathie (DCM) wurde nur ERalpha heraufreguliert (mRNA: 1.8-fach, $p < 0.001$, Protein: 1.9-fach, $p < 0.001$). ERbeta wurde in diesem Zusammenhang nicht reguliert, was sich von den Befunden bei kardialer Hypertrophie unterschied. Dies könnte darauf hinweisen, dass ER bei Herzinsuffizienz verschieden reguliert werden und ERalpha dabei eine herausgehobene physiologische Bedeutung hat. Es konnte kein Geschlechterunterschied in der ER-Expression festgestellt werden, wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass nur 3 von 37 Myokardproben von weiblichen DCM-Patienten stammten. Korrelationsanalysen zwischen ER und Herzinsuffizienz-assoziierten Genen oder hämodynamischen Parametern ergaben keine signifikanten Befunde.

Ein in der Literatur bereits bekannter „single-nucleotide-polymorphism (SNP)“ in Exon 4 des für ERalpha kodierenden Gens (rs1801132) wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden, wobei G/G den am häufigsten vorkommenden Genotyp darstellte. Es wurde keine Assoziation zwischen Allelfrequenz und Geschlecht oder beobachtetem kardialen Phänotyp gesehen. Weiterhin fand sich kein Zusammenhang zwischen Genotyp und vorliegender ERalpha mRNA-Menge, auch nicht nach

Aufteilung in Krankheitsgruppen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Stichproben-Anzahl zu klein war, um statistische Unterschiede sicher erfassen zu können. Ausgehend von den Daten dieser Pilotstudien scheint der untersuchte SNP in Exon 4 von ERalpha kein Kandidat für die Erklärung von Geschlechterunterschieden bei kardialer Hypertrophie oder Herzinsuffizienz zu sein. Dies fügt der quantitativen ERalpha-Analyse, die ebenfalls keinen Geschlechterunterschied zeigte, einen weiteren Befund hinzu.

17beta-Estradiol scheint die Genexpression von ET-1 und ET_A-Rezeptor in humanen kardialen Fibroblasten aus insuffizienten Herzen beeinflussen zu können und somit möglicherweise eine individuelle Komponente in der Beeinflussung des kardialen Remodeling beizutragen. Es zeigte sich jedoch ein uneinheitliches Muster. So war zum Beispiel bei beiden Patienten, die zuvor eine ventrikuläre Herzunterstützungspumpe (VAD) implantiert bekommen hatten, ET-1 nach 6h Stimulation leicht heraufreguliert und nach 24h wieder verringert. Hingegen wurde gar keine Veränderung der ET-1 Genexpression bei den Patienten ohne vorherige VAD-Implantation gesehen. Die zugrundeliegenden Krankheitsbilder und VAD-Therapie könnten daher die Stimulierbarkeit der ET-1 Genexpression durch 17beta-Estradiol beeinflussen. Ähnlich der Situation mit ET-1 wies auch ET_A-Rezeptor nach Stimulation keinen einheitlichen Trend auf. Korrelationsanalysen zwischen ET-1 und ET_A-Rezeptor ergaben keine signifikanten Befunde (6h: $r=0.64$, $p=0.17$; 24h: $r=0.48$, $p=0.34$). Deshalb scheint ein koordinierter Einfluss von 17beta-Estradiol auf beide Komponenten der untersuchten ET-1/ET_A-Rezeptor „Achse“ unwahrscheinlich.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, dass Östrogenrezeptoren (ER) auch in menschlichen Herzen eine physiologische Bedeutung zu haben scheinen. ER stellen somit neue Komponenten im komplexen Zusammenspiel molekularer Mechanismen bei linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz dar. Mögliche vorteilhafte Effekte von ER reflektierten sich in deren erhöhter Expression in linksventrikulären Myokardproben und könnten als kompensatorische Mechanismen verstanden werden. ERbeta scheint ein Kandidat für die Erklärung des Geschlechterunterschieds in der Kompensation kardialer Hypertrophie zu sein. Weitere Studien müssen nun die molekularen Signalwege von ER-Wirkungen aufklären, um deren physiologische Bedeutung besser verstehen zu können.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
ACE-Hemmer	Hemmer des Angiotensin-Converting-Enzyms
AF	aktivierende Domäne
Akt	Proteinkinase B
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aortenklappenstenose
BERKO	Deletion von Östrogenrezeptor beta
BNP	brain natriuretic peptide
bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CnA beta	Calcineurin A beta
CnB	Calcineurin B
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
δp mean	mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe
dNTP	desoxy-Nukleosid-Tri-Phosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleosid-Tri-Phosphat
ER	Östrogenrezeptor(en)
ERalpha	Östrogenrezeptor alpha
ERbeta	Östrogenrezeptor beta
ERKO	Deletion von Östrogenrezeptor alpha
ET(A)-R	ET _A -Rezeptor
ET-1	Endothelin-1
EZM	extrazelluläre Matrix
F-Primer	Vorwärtsprimer
FS	fraktionelle Verkürzung
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HT	Hormontherapie
ICM	ischämische Kardiomyopathie
HCl	Salzsäure
KCl	Kalium-Chlorid
Kon	Kontrolle(n)
LJ	Lebensjahre
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mA	Milliampere

(Weiterführung von 5 Abkürzungsverzeichnis)

Abkürzung	Erklärung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
M	molar
MW	Mittelwert
n	Probenanzahl
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
Pat.	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
r	Korrelationskoeffizient
rKMP	restriktive Kardiomyopathie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
R-Primer	Rückwärtsprimer
RT	reverse Transkription
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus
Tab.	Tabelle(n)
V	Volt
VAD	ventrikuläre Herzunterstützungspumpe
vs.	versus
WT	Wildtyp

6 Literaturverzeichnis

1. Grohe C, Kahlert S, Lobbart K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* 1997;416:107-12.
2. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol.* 2000;24:145-55.
3. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340:1801-11.
4. Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res.* 1997;81:885-92.
5. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81:1535-65.
6. Nilsson S, Koehler KF. Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: molecular and cellular pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;96:15-25.
7. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:4258-65.
8. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, et al. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem.* 1998;273:12101-8.
9. Webb P, Nguyen P, Shinsako J, et al. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol.* 1998;12:1605-18.
10. Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med.* 1998;76:469-79.
11. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J.* 1996;15:2174-83.
12. Lahooti H, Thorsen T, Aakvaag A. Modulation of mouse estrogen receptor transcription activity by protein kinase C delta. *J Mol Endocrinol.* 1998;20:245-59.
13. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, et al. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation.* 1992;86:1099-107.
14. Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol.* 1997;110:135-40.

15. Jovanovic S, Jovanovic A, Shen WK, Terzic A. Low concentrations of 17beta-estradiol protect single cardiac cells against metabolic stress-induced Ca²⁺ loading. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:948-52.
16. van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2001;104:1419-23.
17. Wang Y, Huang S, Sah VP, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.* 1998;273:2161-8.
18. Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, et al. 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation.* 2004;109:269-76.
19. Rosenkranz AC, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH. Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc Res.* 2003;57:515-22.
20. Modena MG, Molinari R, Muia N, Jr., Castelli A, Pala F, Rossi R. Double-blind randomized placebo-controlled study of transdermal estrogen replacement therapy on hypertensive postmenopausal women. *Am J Hypertens.* 1999;12:1000-8.
21. Prahash A, Lynch T. B-type natriuretic peptide: a diagnostic, prognostic, and therapeutic tool in heart failure. *Am J Crit Care.* 2004;13:46-53; quiz 54-5.
22. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC, Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:976-82.
23. Ellmers LJ, Knowles JW, Kim HS, Smithies O, Maeda N, Cameron VA. Ventricular expression of natriuretic peptides in Npr1(-/-) mice with cardiac hypertrophy and fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H707-14.
24. Pina IL. A better survival for women with heart failure? It's not so simple. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2135-8.
25. Simon T, Mary-Krause M, Funck-Brentano C, Jaillon P. Sex Differences in the Prognosis of Congestive Heart Failure : Results From the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS II). *Circulation.* 2001;103:375-380.
26. Ghali JK, Krause-Steinrauf HJ, Adams KF, et al. Gender differences in advanced heart failure: insights from the BEST study. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2128-34.
27. Adams KF, Jr, Sueta CA, Gheorghide M, et al. Gender Differences in Survival in Advanced Heart Failure: Insights From the FIRST Study. *Circulation.* 1999;99:1816-1821.

28. Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest.* 2003;112:302-7.
29. Du XJ. Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res.* 2004;63:510-9.
30. Zhai P, Eurell TE, Cooke PS, Lubahn DB, Gross DR. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1640-7.
31. Pelzer T, Loza PA, Hu K, et al. Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation.* 2005;111:1492-8.
32. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res.* 2004;95:692-9.
33. Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, et al. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation.* 2001;104:2088-94.
34. Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2004;94:884-91.
35. Guerra S, Leri A, Wang X, et al. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res.* 1999;85:856-66.
36. Lindenfeld J, Ghali JK, et al. Hormone replacement therapy is associated with improved survival in women with advanced heart failure. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003;42:1238-1245.
37. Reis SE, Holubkov R, Young JB, White BG, Cohn JN, Feldman AM. Estrogen is associated with improved survival in aging women with congestive heart failure: analysis of the vesnarinone studies. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:529-33.
38. Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, et al. Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. *Circ Res.* 2006;98:590-2.
39. Peter I, Shearman AM, Vasan RS, et al. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women. *Am J Hypertens.* 2005;18:1388-95.
40. 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.

41. Peter I, Shearman AM, Zucker DR, et al. Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study. *J Hypertens.* 2005;23:2193-200.
42. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, Keller PJ. 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension.* 1998;31:522-8.
43. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition modulates cardiac fibroblast growth. *J Hypertens.* 1998;16:377-84.
44. Stewart JA, Jr., Cashatt DO, Borck AC, Brown JE, Carver WE. 17beta-estradiol modulation of angiotensin II-stimulated response in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:97-107.
45. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation.* 1994;89:1580-6.
46. Pacher R, Bergler-Klein J, Globits S, et al. Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1993;71:1293-9.
47. Hafizi S, Wharton J, Chester AH, Yacoub MH. Profibrotic effects of endothelin-1 via the ETA receptor in cultured human cardiac fibroblasts. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14:285-92.
48. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 1991;83:1849-65.
49. Chao HH, Chen JJ, Chen CH, et al. Inhibition of angiotensin II induced endothelin-1 gene expression by 17-beta-oestradiol in rat cardiac fibroblasts. *Heart.* 2005;91:664-9.
50. Nichols HB, Trentham-Dietz A, Hampton JM, et al. From menarche to menopause: trends among US Women born from 1912 to 1969. *Am J Epidemiol.* 2006;164:1003-11.
51. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
52. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science.* 1986;233:1076-8.
53. Neuss M, Regitz-Zagrosek V, Hildebrandt A, Fleck E. Isolation and characterisation of human cardiac fibroblasts from explanted adult hearts. *Cell Tissue Res.* 1996;286:145-53.
54. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:2496-500.
55. Welshons WV, Wolf MF, Murphy CS, Jordan VC. Estrogenic activity of phenol red. *Mol Cell Endocrinol.* 1988;57:169-78.

56. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet.* 2003;12:205-16.
57. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, et al. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation.* 2004;110:3270-5.
58. 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.
59. Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, McCann SM, Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *PNAS.* 2001;98:11765-11770.
60. 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;43:666-74.
61. Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, et al. The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2005;67:604-12.
62. 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.
63. Brum G, Osterrieder W, Trautwein W. Beta-adrenergic increase in the calcium conductance of cardiac myocytes studied with the patch clamp. *Pflugers Arch.* 1984;401:111-8.
64. Osterrieder W, Brum G, Hescheler J, Trautwein W, Flockerzi V, Hofmann F. Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca²⁺ current. *Nature.* 1982;298:576-8.
65. Fernandez-Alfonso MS, Ganten D, Paul M. Mechanisms of cardiac growth. The role of the renin-angiotensin system. *Basic Res Cardiol.* 1992;87 Suppl 2:173-81.
66. Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med.* 2000;6:1221-7.
67. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 1992;357:695-7.
68. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell.* 2000;6:539-50.
69. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998;93:215-28.
70. Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *J. Biol. Chem.* 1998;273:13367-13370.

71. 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;111:1475-86.
72. Stoica A, Saceda M, Doraiswamy VL, Coleman C, Martin MB. Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by epidermal growth factor. *J Endocrinol.* 2000;165:371-8.
73. Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature.* 1999;400:581-5.
74. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Levin ER. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem.* 2005;280:26339-48.
75. Luchner A, Brockel U, Muscholl M, et al. Gender-specific differences of cardiac remodeling in subjects with left ventricular dysfunction: a population-based study. *Cardiovasc Res.* 2002;53:720-7.
76. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998;339:321-8.
77. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, et al. Estrogen receptor- β mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H469-476.
78. Flachskampf FA, Daniel WG. [Aortic valve stenosis]. *Internist (Berl).* 2004;45:1281-90; quiz 1291-2.
79. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17β -Estradiol Reduces Cardiomyocyte Apoptosis In Vivo and In Vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling. *Circ Res.* 2004;95:692-699.
80. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res.* 2000;86:1107-13.
81. Mani K, Kitsis RN. Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003;41:761-764.
82. Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, et al. Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Hum Gene Ther.* 2001;12:2051-63.
83. Perriard JC, Hirschy A, Ehler E. Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:30-8.
84. Kadokami T, McTiernan CF, Higuichi Y, Frye CS, Kubota T, Feldman AM. 17β Estradiol improves survival in male mice with cardiomyopathy induced by cardiac-specific tumor necrosis factor-alpha overexpression. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25:254-60.

85. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-2.
86. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341:1276-83.
87. Junqueira L, Carneiro J. *Histologie, 4.Auflage*: Springer; 1996.
88. Fromaget C, el Aoumari A, Gros D. Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*. 1992;51:9-20.
89. Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, et al. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:359-71.
90. Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation*. 2000;101:547-52.
91. Chung TH, Wang SM, Wu JC. 17beta-estradiol reduces the effect of metabolic inhibition on gap junction intercellular communication in rat cardiomyocytes via the estrogen receptor. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37:1013-22.
92. Oltra E, Pfeifer I, Werner R. Ini, a small nuclear protein that enhances the response of the connexin43 gene to estrogen. *Endocrinology*. 2003;144:3148-58.
93. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000;342:1077-84.
94. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*. 1989;80:564-72.
95. Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen Causes Dynamic Alterations in Endothelial Estrogen Receptor Expression. *Circ Res*. 2002;91:814-820.
96. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001;276:36869-72.
97. Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, et al. Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett*. 2001;502:103-8.
98. Jurada S, Marc J, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R. Codon 325 sequence polymorphism of the estrogen receptor alpha gene and bone mineral density in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;78:15-20.

99. Hoshino S, Hosoi T, Miyao M, et al. Identification of a novel polymorphism of estrogen receptor-alpha gene that is associated with calcium excretion in urine. *J Bone Miner Metab.* 2000;18:153-7.
100. Hsiao WC, Young KC, Lin SL, Lin PW. Estrogen receptor-alpha polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 2004;6:R180-6.
101. Capon F, Allen MH, Ameen M, et al. A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet.* 2004;13:2361-8.
102. Bilsel AS, Moini H, Tetik E, Aksungar F, Kaynak B, Ozer A. 17Beta-estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2000;46:579-84.
103. Akishita M, Kozaki K, Eto M, et al. Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:17-21.
104. Thompson LO, Skrabal CA, Loebe M, et al. Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients. *J Surg Res.* 2005;123:25-32.
105. Zhao XS, Pan W, Bekeredjian R, Shohet RV. Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation.* 2006;114:830-7.
106. Wang TH, Tan Z, Liu PQ, Lu W, Yang D, Pan JY. [Down-regulation of ETA receptor of vascular smooth muscle cells by 17 beta-estradiol]. *Sheng Li Xue Bao.* 2001;53:380-4.
107. Mercier I, Mader S, Calderone A. Tamoxifen and ICI 182,780 negatively influenced cardiac cell growth via an estrogen receptor-independent mechanism. *Cardiovasc Res.* 2003;59:883-92.

7 Erklärung

„Ich, Johannes Nordmeyer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Östrogenrezeptoren im humanen linksventrikulären Myokard – eine neue molekulare Komponente bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

12. August 2007

8 Danksagungen

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des vorliegenden Dissertationsthemas und ihre kontinuierliche Unterstützung danken. Ihre kritischen Anregungen haben die vorliegende Arbeit und mein wissenschaftliches Interesse nachhaltig gefördert. Weiterhin hat mir Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek im Rahmen eines Stipendiums des von ihr geleiteten DFG-Graduiertenkollegs eine breite Ausbildung in molekularer Grundlagenforschung ermöglicht, wofür ihr mein besonderer Dank gilt. Auch für die Förderung meiner Publikations-Aktivitäten bin ich Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek dankbar.

Herrn Prof. Dr. Martus aus dem Institut für Medizinische Biometrie danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Frau Dr. Shokoufeh Mahmoodzadeh danke ich für ihre Unterstützung bei der Interpretation von Ergebnissen und für ihre wertvollen Ratschläge.

Besonders möchte ich mich bei Sarah Eder für die intensive Zusammenarbeit und wissenschaftliche Diskussion, ihre großartige Unterstützung und all die schönen Momente der vergangenen Jahre bedanken. Meinen Mitdoktoranden Lars Herda, Jan Bass und Ulrike Gemke danke ich für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit.

MTA Britta Hannack und MTA Jenny Thomas danke ich für ihre engagierten Hilfestellungen und zahlreichen Ratschläge zu Beginn der Laborarbeit.

Philipp Eder danke ich für seine Hilfe beim Layout der vorliegenden Dissertation.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. für ihre großzügige Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung, Liebe und Fürsorge das Medizinstudium und die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

10 Publikationsliste

Originalarbeiten

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 receptors in human aortic stenosis. *Circulation*. 2004; 110:3270-5.
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 up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J*. 2006; 20(7):926-34.
3. Nordmeyer J, Khambadkone S, Coats L, Schievano S, Lurz P, Parenzan G, Taylor AM, Lock JE, Bonhoeffer P. Risk stratification, systematic classification, and anticipatory management strategies for stent fracture after percutaneous pulmonary valve implantation. *Circulation*. 2007; 115(11):1392-7.

Kongressbeiträge

1. Steege A, Nordmeyer J, Pregla R, Regitz-Zagrosek V. The EDG-receptors are functional in cardiac fibroblasts and are regulated in human heart failure. *Zeitschrift für Kardiologie* 2003. 92 (Suppl 1): I/117.
2. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P, Weiske J, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Die Heraufregulation und die Relokalisation des kardialen Östrogenrezeptors α bei menschlicher dilatativer Kardiomyopathie. *Clinical Research in Cardiology* 2006; 95 (Suppl 5): P399.
3. Nordmeyer J, Coats L, Khambadkone S, Boudjemline Y, Walker F, Cullen S, Deanfield J, Derrick G, Taylor AM, Bonhoeffer P. Repeat Percutaneous Pulmonary Valve (PPV) Implantation as Treatment of Suboptimal Results in Patients with Early PPV Stent Failure. *World Congress of Pediatric Cardiology 2005*.
4. Coats L, Khambadkone S, Derrick G, Schievano S, Nordmeyer J, Boudjemline Y, Deanfield J, Taylor AM, Bonhoeffer P. Percutaneous Pulmonary Valve Implantation in Humans: An Update in 88 Patients. *American Heart Association Scientific Sessions 2006*.
5. Nordmeyer J, Coats L, Cullen S, Walker F, Deanfield J, Haworth S, Bonhoeffer P. Extending the Indications for Percutaneous Pulmonary Valve Implantation. *Association for European Paediatric Cardiology 2006*.

6. Nordmeyer J, Khambadkone S, Coats L, Schievano S, Parenzan G, Taylor AM, Lock JE, Bonhoeffer P. Analysis of Stent Fractures after Percutaneous Pulmonary Valve Implantation. *American Heart Association Scientific Sessions 2006*.
7. Nordmeyer J, Coats L, Taylor AM, Khambadkone S, Derrick G, Lee TY, Walker F, Bonhoeffer P. Benefits of Percutaneous Pulmonary Valve Implantation are Sustained after 1 year. *American Heart Association Scientific Sessions 2006*.
8. Marazia S, Khambadkone S, Coats L, Parenzan G, Nordmeyer J, Lee TY, Deanfield J, Cullen S, Taylor AM, Bonhoeffer P. Right Ventricular Outflow Tract Characteristics can Predict Successful Outcome for Percutaneous Pulmonary Valve Implantation – “Learning Curve” Analysis of Novel Technique. *American Heart Association Scientific Sessions 2006*.
9. Nordmeyer J, Frigiola A, Lurz P, Coats L, Norman W, Franklin O, Bonhoeffer P, Taylor A. Valve Competence One Year After Percutaneous Pulmonary Valve Implantation Or Surgical Homograft Implantation Assessed By Magnetic Resonance Imaging. *ACC 56th Annual Scientific Session 2007*.
10. Nordmeyer J, Capelli C, Schievano S, Lurz P, Petrini L, Lattanzio S, Migliavacca F, Bonhoeffer P. Big Balloons Achieve Better Dilatation Results Below Burst Pressure Than Small High-Pressure Balloons – A Biomechanical Analysis. *ACC 56th Annual Scientific Session 2007*.
11. Lurz P, Nordmeyer J, Coats L, Khambadkone S, Derrick G, Cullen S, Deanfield J, Boudjemline Y, Taylor AM, Bonhoeffer P. 6 Years’ Experience Of Outcome After Percutaneous Pulmonary Valve Implantation. *ACC 56th Annual Scientific Session 2007*.
12. Lurz P, Nordmeyer J, Coats L, Khambadkone S, Odendaal D, Mist B, Taylor AM, Bonhoeffer P, Derrick G. Acute Changes in Exercise Performance after Relief of Unfavourable Right Ventricular Loading Condition. *ACC 56th Annual Scientific Session 2007*.
13. Nordmeyer J, Lurz P, Bolger AP, Coats L, Frigiola A, Walker F, Cullen S, Bonhoeffer P. From complications to changes in approach – experience with percutaneous pulmonary valve implantation. *Association for European Paediatric Cardiology 2007*.
14. Nordmeyer J, Lurz P, Coats L, Khambadkone S, Frigiola A, Cullen S, Yates R, Bonhoeffer P. Repeat percutaneous pulmonary valve implantation: proof of principle as long-term management strategy of RVOT dysfunction. *Association for European Paediatric Cardiology 2007*.

Übersichtsarbeiten

1. Nordmeyer J, Lee TY, Bonhoeffer P. Percutaneous pulmonary valve implantation: a 5-year projection. *Am Heart Hosp J*. 2006; 4(3):205-6.
2. Nordmeyer J, Coats L, Bonhoeffer P. Current experience with percutaneous pulmonary valve implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Summer; 18 (2):122-5.
3. Nordmeyer J, Bonhoeffer P. Placing a new technique into clinical practice. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2006 Nov; 4(6):773-5.
4. Khambadkone S, Nordmeyer J, Bonhoeffer P. Percutaneous implantation of the pulmonary and aortic valves: indications and limitations. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2007 Jan; 8(1):57-61.