

**Analyse der Rolle des Östrogenrezeptors α nach Myokardinfarkt
anhand eines transgenen Mausmodells**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Joachim Leber

aus Braunschweig

Berlin, 2014

Aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Charité Berlin
angefertigt zwischen 2009-2014
unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek
eingereicht
über das Institut für Pharmazie
der Freien Universität Berlin

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Matthias Melzig
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek

Disputation am 20. November 2014

Danksagung

Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek möchte ich ganz herzlich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Die ausgezeichneten Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Bearbeitung, die kritischen Diskussionen und die hilfreichen Anmerkungen haben dazu beigetragen, diese Arbeit zu verbessern.

Herrn Prof. Dr. Matthias Melzig von der Freien Universität Berlin möchte ich für die freundliche Bereitschaft danken, meine Doktorarbeit zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Shokoufeh Mahmoodzadeh. Als meine direkte Betreuerin hatte sie von Beginn an Vertrauen in mich und half mir bei Schwierigkeiten jederzeit durch ihre kompetente Unterstützung. Ihre Bereitschaft, die von mir erzielten Ergebnisse in oft stundenlangen Sitzungen zu diskutieren, war außergewöhnlich. Für die wertvollen Ratschläge und ihr Bemühen, das Bestmögliche aus dieser Arbeit zu machen, kann ich gar nicht genug danken.

Ich habe wertvolle Unterstützung von verschiedenen Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe erhalten, die mir sowohl Zeit, Erfahrung als auch persönliche Unterstützung gewidmet haben. Daher bedanke ich mich bei allen, die mir während meiner Zeit als Doktorand geholfen haben. Im Speziellen möchte ich mich bei Frau Dr. Katleen Cantow und Frau Dr. Christina Westphal für das Erlernen der Infarktinduktion und Echokardiographie sehr herzlich bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Xiang Zhang, der zusammen mit mir die ER α OE-Mäuse untersucht hat. Neben seiner Hilfe bei praktischen Arbeiten haben die vielen Diskussionen und gemeinsam gefassten Entschlüsse das wissenschaftliche Arbeiten leichter gemacht.

Für die Bereitstellung des Elektronenmikroskops und die fachkundige Einführung in die Bedienung sowie die Anfertigung der Präparate möchte ich Frau Petra Schrade aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Bachmann am Virchow-Klinikum danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Allen meinen Freunden, vielen Dank für die schönen gemeinsamen Erlebnisse in guten Zeiten und das Ermuntern zum Durchhalten in schlechten Zeiten.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester. Sie haben mich durch mein Studium und diese Doktorarbeit geführt und aus der Ferne sowohl seelisch wie auch finanziell in allen Lebenssituation unterstützt. Ohne Ihre Hilfe wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
1.1	Myokardinfarkt	10
1.1.1	Allgemeines	10
1.1.2	Intrazelluläre Veränderungen nach einem Herzinfarkt	10
1.1.3	Neurohumorale Veränderungen nach einem Herzinfarkt	12
1.2	Geschlechterunterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen	12
1.3	Einflüsse von Geschlechtshormonen bei kardiovaskulären Erkrankungen	13
1.4	Durch Östrogen gesteuerte intrazelluläre Signalwege	14
1.5	Effekte der Östrogenrezeptoren α und β während des Herzinfarkts	16
1.6	Das Mausmodell ERαOE	17
1.7	Ziele dieser Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Allgemeine Laborausstattung	19
2.1.2	Geräte und Materialien für Tierexperimente	20
2.1.3	Geräte und Materialien für die Histologie	20
2.1.4	Chemikalien	21
2.1.5	Antikörper	22
2.1.6	Reagenziensätze (Kits)	23
2.1.7	Puffer und Lösungen	23
2.1.7.1	Messung der mitochondrialen Respiration	23
2.1.7.2	Proteinextraktion	26
2.1.7.3	Western-Blot	26
2.1.8	Primer	28
2.1.9	Computerprogramme	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Tierexperimentelle Arbeiten	30
2.2.1.1	Generierung der Mauslinie mit herzspezifischer ER α -Überexpression	30
2.2.1.2	Züchtung und Haltung	31
2.2.1.3	Versuchsgruppen	32
2.2.1.4	Infarktinduktion und postoperative Versorgung	32

2.2.1.5	Sham-Operation	36
2.2.1.6	Echokardiographie	36
2.2.1.6.1	B-Mode (Brightness-Mode)	37
2.2.1.6.2	Berechnung der linksventrikulären Masse	37
2.2.1.6.3	Berechnung der Ejektionsfraktion	38
2.2.1.6.4	Berechnung der Infarktgröße	39
2.2.1.7	Organentnahme	40
2.2.1.8	Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten und Zellkultur	41
2.2.2	Messung der mitochondrialen Respiration	41
2.2.3	Histologische Untersuchungen	43
2.2.3.1	Herstellung von Paraffinschnitten	43
2.2.3.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	44
2.2.3.3	Immunhistologie	45
2.2.4	Transmissionselektronenmikroskopie	45
2.2.5	Molekularbiologische Methoden	46
2.2.5.1	Genotypisierung	46
2.2.5.1.1	DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien	46
2.2.5.1.2	PCR und Agarose-Gelelektrophorese	46
2.2.5.2	Isolierung von RNA	47
2.2.5.3	Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	48
2.2.5.4	Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription aus mRNA	48
2.2.5.5	<i>Real time</i> (Echtzeit)-PCR	49
2.2.5.6	Proteinextraktion aus Myokardgewebe	50
2.2.5.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
2.2.5.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
2.2.5.9	Coomassie Brilliant Blue-Färbung	51
2.2.5.10	Western-Blot	51
2.2.5.11	Immunologischer Nachweis von Proteinen	52
2.2.6	Statistik	52
3	ERGEBNISSE	54
3.1	ERαOE-Mäuse weisen eine gesteigerte ERα-Expression auf	54
3.2	Die ERα-Überexpression ist herzspezifisch	58
3.3	Auswirkungen der Infarktinduktion auf das Überleben und die Herzfunktion	58
3.3.1	Die ER α -Überexpression hat keine Auswirkung auf das Überleben nach Myokardinfarkt	58

3.3.2	Die Infarktgröße ist bei ER α OE-Mäusen tendenziell geringer	60
3.3.3	Die systolische Herzfunktion ist bei ER α OE-Mäusen im Grundzustand gegenüber Wildtypen reduziert	61
3.4	ERαOE-Mäuse weisen eine Herzhypertrophie auf	64
3.4.1	Das Herzgewicht und die linksventrikuläre Masse der ER α OE-Mäuse ist erhöht	64
3.4.2	Die Hypertrophie der ER α OE-Mäuse geht mit einem Längenwachstum der Kardiomyozyten einher	65
3.4.3	Die Expression von Hypertrophiemarkern ist bei ER α OE-Mäusen im Grundzustand erhöht	66
3.5	Die ERα-Überexpression vermindert die Expression von Remodeling-assoziierten Genen nach einem Myokardinfarkt	68
3.6	ERαOE-Mäuse zeigen eine reduzierte Expression von Ca²⁺-Signaling-assoziierten Genen	70
3.7	Auswirkung der ERα-Überexpression auf die Biogenese, Funktion und strukturelle Integrität der Mitochondrien vor und nach Infarktinduktion	73
3.7.1	Die ER α -Überexpression steigert den Gehalt an mitochondrialer DNA	73
3.7.2	Die ER α -Überexpression reduziert die Expression von Genen, die mit der Biogenese von Mitochondrien assoziiert sind	75
3.7.3	Untersuchung der mitochondrialen Funktion	78
3.7.3.1	Untersuchung der Expression der verschiedenen Komplexe der Atmungskette	79
3.7.3.2	Nach einem Infarkt zeigen ER α OE-Männchen eine höhere Mitochondrienatmung im Remote-Bereich als Wildtyp-Männchen	83
3.7.3.3	Infarzierte männliche ER α OE-Mäuse neigen zur perinukleären Akkumulation von Mitochondrien in Kardiomyozyten des Perinfarktbereichs	86
4	DISKUSSION	89
4.1	Effekt der ERα-Überexpression im Grundzustand	89
4.1.1	Die ER α -Überexpression führt zur Herzhypertrophie	90
4.1.2	Die ER α -Überexpression führt zur verminderten Kontraktilität des Herzens im Grundzustand	93
4.2	Effekt der ERα-Überexpression auf das Überleben und die Herzfunktion nach Myokardinfarkt	94
4.2.1	Bei weiblichen Tieren wirkt die ER α -Überexpression nach der akuten Phase des MI protektiv	94

4.2.2	Die ER α -Überexpression hat keinen Einfluss auf die Rupturrate nach MI	95
4.2.3	ER α OE-Mäuse haben tendenziell kleinere Infarkte als WT-Mäuse	96
4.2.4	Die Herzfunktion nach MI wird durch die ER α -Überexpression nicht beeinflusst	97
4.3	Einfluss der ERα-Überexpression auf die Mitochondrien	97
4.3.1	Die ER α -Überexpression steigert den Gehalt an mitochondrialer DNA	98
4.3.2	Die ER α -Überexpression wirkt im Perinfarktbereich männlicher Mäuse protektiv	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	SUMMARY	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	103

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
Col1	Kollagen Typ I
Col3	Kollagen Typ III
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPN	2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitril
EF	Ejektionsfraktion (Auswurffraktion)
EKG	Elektrokardiogramm
ER	<i>Estrogen receptor</i> (Östrogenrezeptor)
ER α OE	ER α <i>overexpression</i> (ER α -Überexpression)
E2	17 β -Östradiol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fw	<i>forward</i> (vorwärts)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IgG	Immunglobulin G
I/R	Ischämie/Reperfusion
KG	Körpergewicht
KO	knockout
LV	Linker Ventrikel, linksventrikulär
m	männlich
Mef2a	<i>myocyte enhancer factor 2a</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MHz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
Myh6	<i>α myosin heavy chain</i>
Myh7	<i>β myosin heavy chain</i>
n	Anzahl der Tiere

NFκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NADH	Nicotinamidadeninucleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NPPA	<i>atrial natriuretic propeptide</i>
NPPB	<i>brain natriuretic propeptide</i>
Nrf	<i>nuclear respiratory factor</i>
OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PGC1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α</i>
PLN	Phospholamban
ppm	<i>parts per million</i>
PPT	4,4',4''-(4-propyl-(1 <i>H</i>)-pyrazole-1,3,5-triyl)-trisphenol
Rev	<i>reverse</i> (rückwärts)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Ryr2	<i>ryanodine receptor</i> (Ryanodinrezeptor)
Serca2a	<i>Sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase 2a</i> (sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumenprozent)
w	weiblich
w/v	<i>weigh/volume</i> (Gewichtsprozent)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Allgemeines

Die koronare Herzkrankheit und insbesondere der Herzinfarkt stellen in Industrieländern eine der häufigsten Todesursachen dar. 2011 starben in Deutschland 342233 Menschen infolge von Herz-/Kreislaufkrankungen. Damit sind Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems für etwa 40% aller Todesfälle verantwortlich (Statistisches Bundesamt, Stand 2011). Globale Schätzungen gehen davon aus, dass 2008 kardiovaskuläre Erkrankungen bei ungefähr 17,3 Millionen Menschen zum Tode führten, was 30% der weltweit erfassten Todesfälle entspricht (Quelle: WHO).

1.1.2 Intrazelluläre Veränderungen nach einem Herzinfarkt

Unter dem Begriff der koronaren Herzkrankheit versteht man die Manifestation der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien. Bei einem Herzinfarkt kommt es infolge der arteriosklerotischen Veränderungen zum Verschluss des Blutgefäßes, was innerhalb kürzester Zeit eine irreversible Schädigung des Herzmuskelgewebes hervorruft (Anversa et al., 1998, Langer et al., 1987).

Die normale Herzfunktion beruht im Wesentlichen auf der ausreichenden Zufuhr von Sauerstoff und Substraten zur Generierung von ATP, um die Energieversorgung des Organs zu gewährleisten. In der akuten ischämischen Phase nach einem Infarkt führt die fehlende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen dazu, dass die mitochondriale Fettsäureoxidation, welche im Herzen vorrangig zur ATP-Gewinnung dient, zum Erliegen kommt. Wegen des Sauerstoffmangels wird vermehrt die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung genutzt, durch die aber weniger ATP gewonnen werden kann (Ferrari, 1995, Neubauer, 2007). Im Folgenden steigt die Konzentration von Laktat sowie freiem Phosphat an und der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) sinkt (Opie and Sack, 2002, Murphy and Steenbergen, 2008). Um den normalen pH_i wiederherzustellen, steigt die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers, der Protonen aus der Zelle ausschleust und im Gegenzug Natriumionen in die Zelle aufnimmt (Eigel and Hadley, 1999). Da jedoch infolge des ATP-Mangels die nun erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration nicht über die Na^+/K^+ -ATPase normalisiert werden kann, kommt es durch Umkehren der Funktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters zur stärkeren Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol (Halestrap et al., 2007). Wiederum durch den Mangel an ATP ist die Aufnahme des überschüssigen Calciums ins sarkoplasmatische Retikulum durch die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (Serca2a) eingeschränkt (Ferdinandy et al., 2007). Die erhöhte intrazelluläre Akkumulation von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen führt zum osmotischen Anschwellen der Kardiomyozyten, was eine Instabilität der Zellmembran bis hin zur Ruptur fördert. Dies und die gleichzeitige Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteasen und

Phospholipasen kann zum Sterben der Kardiomyozyten durch Nekrose bzw. Apoptose führen (Ferdinandy et al., 2007). Die gestörte intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase kann außerdem die Reizweiterleitung zwischen benachbarten Kardiomyozyten unterbinden und tödliche Herzarrhythmien auslösen (del Monte et al., 2004, Nattel et al., 2007).

Nach der akuten ischämischen Phase folgt die sog. inflammatorische Phase. Hier sorgt die Aktivierung des Komplementsystems dafür, dass chemotaktische Botenstoffe freigesetzt werden, die neutrophile Granulozyten ins infarzierte Myokard locken. Diesen folgen weitere Immunzellen wie Lymphozyten oder Makrophagen, welche tote Myozyten abbauen (Frangogiannis, 2012). Beim Übergang von der inflammatorischen in die proliferative Phase werden einerseits die pro-inflammatorischen Signale unterdrückt und andererseits abgestorbenes Gewebe ersetzt. So werden Fibroblasten angelockt, welche zu Myofibroblasten differenzieren und dann Proteine der extrazellulären Matrix sezernieren. Myofibroblasten produzieren unter anderem Kollagen I und zeitversetzt Kollagen III, wodurch die Infarkt Narbe aufgebaut wird. Außerdem sorgen Endothelzellen für die Ausbildung neuer Blutgefäße, die die Versorgung der heilenden Wunde mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellen (Dobaczewski et al., 2010). In der letzten Phase der Wiederherstellung (*Remodeling*) des Myokards, der sog. Reifungsphase, gewinnt die Infarkt Narbe durch Quervernetzung der Kollagenfasern an Stabilität (Dobaczewski et al., 2010).

Die strukturellen Veränderungen im Verlauf des Heilungsprozesses nach einem Herzinfarkt betreffen jedoch nicht nur das Infarktgebiet, sondern auch die Bereiche des Myokards, die nicht unmittelbar von der Ischämie betroffen waren (*Remote*-Bereich). Der Verlust an kontraktile Masse resultiert in einem verminderten Schlagvolumen, d.h. es wird pro Herzschlag weniger Blut als nötig in den Kreislauf gepumpt. Kompensatorisch kommt es daher im *Remote*-Bereich des Myokards zur Hypertrophie der Kardiomyozyten. Dieses Wachstum wird sowohl durch den mechanischen Stress als auch durch neurohumorale und parakrine Regulatoren ausgelöst (Sutton and Sharpe, 2000). Da nach einem Herzinfarkt sowohl eine größere Drucklast als auch ein erhöhtes Blutvolumen im linken Ventrikel auftreten, kommt es gleichzeitig zu einem Breiten- wie auch Längenwachstum der Myozyten (Anversa et al., 1985). Hierbei kann die Zellgröße um bis zu 78% zunehmen (Anversa et al., 1986). Neben der Vergrößerung der Myozyten ist aber zusätzlich die exzessive Einlagerung von interstitiellem Kollagen zu beobachten (Zhao et al., 1987, Ertl and Frantz, 2005). Dieser als Fibrose bezeichnete Vorgang führt zur mechanischen Versteifung des Gewebes. Zusätzlich verringert sich mit fortschreitendem Grad der Fibrosierung die Kapillardichte (Anversa et al., 1990, Olivetti et al., 1990), wodurch die Sauerstoffversorgung der Myozyten erschwert wird und insgesamt eine lokale Hypoxie auftritt. Wenn dieser Prozess der Myozytenhypertrophie bei gleichzeitig geringer werdender Versorgung mit Nährstoffen ein bestimmtes Maß überschreitet, kann die anfängliche Kompensation der verringerten

Pumpleistung des Herzens zur Maladaptation werden und ein Fortschreiten hin zur Herzinsuffizienz fördern (Gradman and Alfayoumi, 2006, Oka and Komuro, 2008).

1.1.3 Neurohumorale Veränderungen nach einem Herzinfarkt

Nach einem Herzinfarkt werden neurohumorale Mechanismen in Gang gesetzt, um der verminderten Pumpleistung des Herzens und somit der Unterversorgung des gesamten Körpers entgegenzuwirken. Das sympathische Nervensystem wird aktiviert, um die Herzfrequenz zu steigern (Lombardi et al., 1996). Zudem wirken das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sowie Vasopressin und Endotheline (Adams, 2004, Braunwald and Bristow, 2000, Volpe et al., 2002), wodurch einerseits die Salz- und Wasserretention in den Nieren verstärkt und andererseits der periphere Blutgefäßwiderstand erhöht wird. Die hierdurch erzielte Blutvolumenexpansion und Blutdruckerhöhung dient dazu, einen suffizienten Kreislauf aufrecht zu erhalten. Diesen vasokonstriktorisches und flüssigkeitsretinierenden Systemen stehen antagonistische Faktoren, wie das *atrial natriuretic peptide* (ANP) und *brain natriuretic peptide* (BNP) gegenüber. Im adulten Herzen wird ANP im Wesentlichen aus dem Vorhof, BNP aus dem linken Ventrikel freigesetzt. Sie bewirken eine Vasodilatation, fördern die Natriumausscheidung durch die Niere und haben antiproliferative Effekte im Herzen (Baxter, 2004, Dietz, 2005, Hall, 2004).

Durch die Aktivierung volumenretinierender Systeme und die zunehmende Vasokonstriktion wird zwar der Blutdruck aufrechterhalten, jedoch führt der gesteigerte venöse Rückstrom zum Herzen zu einer Erhöhung des ventrikulären Füllungsdruckes. Die Wandspannung bewirkt eine Dehnung der Vorhöfe sowie der Kammern, was sowohl die ANP- als auch BNP-Freisetzung weiter steigert. Außerdem haben die erhöhte Herzfrequenz und die Vasokonstriktion einen höheren Sauerstoffverbrauch zur Folge.

Ist die Balance zwischen obigen agonistischen und antagonistischen Faktoren nicht mehr ausgewogen, kann das Entstehen einer Herzinsuffizienz begünstigt werden (Weil and Schunkert, 2006).

1.2 Geschlechterunterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen

Insgesamt treten Herzinfarkte bei Frauen seltener als bei Männern auf. So erlitten 2011 insgesamt 55286 Menschen einen Herzinfarkt, wovon 44,4% Frauen und 55,6% Männer waren (Statistisches Bundesamt, Stand 2011). Sowohl klinische Befunde als auch Beobachtungen aus tierexperimentellen Studien unterstützen die Vermutung, dass bei kardiovaskulären Erkrankungen sowohl hinsichtlich der Inzidenz als auch der Pathogenese geschlechtsspezifische Aspekte eine Rolle spielen (Regitz-Zagrosek, 2006).

Bei erhöhter Arbeitslast des Herzens, beispielsweise infolge einer Verengung der aus dem Herzen führenden Aorta, muss eine größere Herzmuskelmass aufgebaut werden. Die Form

der Herzhypertrophie ist jedoch bei Frauen und Männern verschieden. Typischerweise neigen Frauen zu einer sog. konzentrischen Hypertrophie, d.h. einer Verdickung der Herzwand. Männer hingegen entwickeln eine ekzentrische Hypertrophie, d.h. eine Dilatation des Herzens bei nahezu gleichbleibender Wanddicke (Kuch et al., 1998, Regitz-Zagrosek et al., 2007). Kann das Herz trotz der kompensatorischen Hypertrophie die Blutversorgung des Körpers nicht mehr aufrechterhalten, spricht man von einer Herzinsuffizienz. Aufgrund der unterschiedlichen Formen der Herzhypertrophie ist bei männlichen Patienten mit einer Herzinsuffizienz charakteristischerweise eine sog. systolische Dysfunktion (Verminderung der Ejektionsfraktion; EF) zu beobachten. Dagegen bleibt bei weiblichen Herzinsuffizienzpatienten die systolische Herzfunktion weitestgehend erhalten. Aufgrund der verdickten, steiferen Herzwand ist aber die Relaxation des Herzmuskels erschwert und sie leiden an einer sog. diastolischen Dysfunktion (Cleland et al., 2003, Regitz-Zagrosek et al., 2007).

1.3 Einflüsse von Geschlechtshormonen bei kardiovaskulären Erkrankungen

Aus epidemiologischer Sicht ist auffällig, dass die Inzidenz von ischämischen Herzerkrankungen bei Frauen nach Erreichen der Menopause sprunghaft ansteigt. So wurde bei Frauen nach der Menopause ein 10fach gesteigertes Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet. Gleichaltrige Männer zeigten dagegen nur eine Zunahme um das 4,6fache (Duvall, 2003). Während die Diagnose Herzinfarkt oder schwere koronare Herzerkrankung in der Altersgruppe bis 65 Jahre bei Männern ungefähr dreimal häufiger als bei Frauen gestellt wird, sind in der Altersgruppe von 65-74 Jahren Männer vergleichsweise nur noch doppelt so häufig betroffen. In der Altersgruppe über 75 Jahre sind sogar mehr Frauen als Männer betroffen (Roger et al., 2012).

Zudem konnten verschiedene Studien an Tieren, die genetisch verändert oder mit Medikamenten behandelt wurden, das Bestehen von Geschlechterunterschieden im kardiovaskulären System untermauern und zeigten, dass weibliche Tiere ein weniger schweres Krankheitsbild und eine geringere Mortalität als männliche Tiere aufwiesen (Leinwand, 2003, Luczak and Leinwand, 2009). So konnte bei Mäusen beobachtet werden, dass Männchen nach einem Herzinfarkt eher als Weibchen dazu tendieren, an einer Herzruptur zu sterben (Cavasin et al., 2004, Gao et al., 2005). Außerdem ist die linksventrikuläre Funktion signifikant schlechter, die Dilatation der Herzkammer größer und die Kardiomyozyten weisen eine stärkere Hypertrophie auf als bei Weibchen (Cavasin et al., 2004, Fang et al., 2007). Anhand des Infarktmodells sowie anhand des Tiermodells der Ischämie und Reperfusion (I/R), bei dem der Verschluss des Koronargefäßes nach einer gewissen Zeitspanne aufgehoben wird und somit das ischämische Areal des linken Ventrikels wieder mit Blut versorgt wird, konnten weitere geschlechtsspezifische

Unterschiede nachgewiesen werden. So traten bei weiblichen Tieren kleinere Infarkte auf und gleichzeitig war die Apoptose bzw. Nekrose von Kardiomyozyten in männlichen Tieren signifikant erhöht (Bae and Zhang, 2005, Booth et al., 2003, Brown et al., 2005, Johnson et al., 2006, van Eickels et al., 2003). In I/R-Experimenten konnte auch gezeigt werden, dass die Pumpfunktion des Herzens bei Weibchen nach der Reperfusion schneller als bei Männchen wiederhergestellt ist (Bae and Zhang, 2005, Wang et al., 2006b).

Alle diese Daten deuten darauf hin, dass das weibliche Geschlechtshormon Östrogen und/oder das männliche Geschlechtshormon Testosteron einen Einfluss auf die molekularen Vorgänge nach einem Herzinfarkt oder nach dem durch Ischämie/Reperfusion bedingten Schaden haben kann. Beispielhaft zu erwähnen ist hierbei eine Studie von Cavasin und Mitarbeitern (Cavasin et al., 2006), die Herzinfarkte in weiblichen und männlichen Mäusen induzierten, wobei den Tieren die Ovarien, dem wesentlichen Produktionsort von Östrogen, bzw. die Hoden, der wesentlichen Quelle von Testosteron, entfernt worden waren. Wurde weiblichen ovariectomierten Tieren künstlich Testosteron zugeführt, starben sie ebenso häufig wie Männchen infolge einer Herzruptur. Wurden andererseits gonadectomierte Männchen mit Östrogen supplementiert, waren sie vor Herzrupturen geschützt (Cavasin et al., 2006). I/R-Experimente, die die Wirkung einer Ovariectomie untersuchten, untermauern die kardioprotektive Wirkung von Östrogen. So verlangsamt die Ovariectomie die Wiederherstellung der Herzpumpfunktion nach I/R und die Infarktgrößen sind erhöht (Booth et al., 2003, Kolodgie et al., 1997, Liu et al., 2004). Wird diesen ovariectomierten Tieren jedoch künstlich Östrogen zugeführt, werden diese negativen Effekte wieder aufgehoben (Booth et al., 2003, Kolodgie et al., 1997, Liu et al., 2004).

1.4 Durch Östrogen gesteuerte intrazelluläre Signalwege

Die Wirkung von Östrogen wird im Wesentlichen über die beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β vermittelt. Beide Rezeptoren wurden in kardialen Fibroblasten und Myozyten sowohl beim Menschen als auch bei der Maus identifiziert (Grohe et al., 1997, Mahmoodzadeh et al., 2006, Nordmeyer et al., 2004). Bei den über diese Rezeptoren ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden können sowohl schnelle, nicht-genomische als auch langsamere, genomische Effekte beobachtet werden (Levin, 2005, Mendelsohn, 2002, Mendelsohn and Karas, 2005, Regitz-Zagrosek, 2006, Bjornstrom and Sjoberg, 2005).

Beim „klassischen“ genomischen Signalweg kommt es nach der Bindung von Östrogen an den Rezeptor zur Rezeptordimerisation, der Translokation in den Zellkern und dort zur Bindung an Östrogen-responsive Elemente (EREs) in Promotoren von Zielgenen (Bourdeau et al., 2004) (Abb. 1, Signalweg 1). Alternativ können beim nicht-klassischen genomischen Signalweg Östrogenrezeptoren im Kern mit anderen Transkriptionsfaktoren wie *activator protein 1* (AP-1) (Umayahara et al., 1994), *specificity protein 1* (Sp-1) (Petz and Nardulli,

2000) oder NF- κ B (Kalaitzidis and Gilmore, 2005) wechselwirken und so die Expression von Genen, die keine EREs aufweisen, positiv oder negativ beeinflussen (Abb. 1, Signalweg 2). Die nicht-genomischen Effekte laufen innerhalb von wenigen Minuten ab und sind unabhängig von transkriptioneller Aktivierung von Zielgenen. Nach Bindung von Östrogen an den Rezeptor in der Zellmembran sorgt dieser für die Aktivierung weiterer Effektoren wie z. B. der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (Kim et al., 1999, Banerjee et al., 2013) (Abb. 1, Signalweg 4).

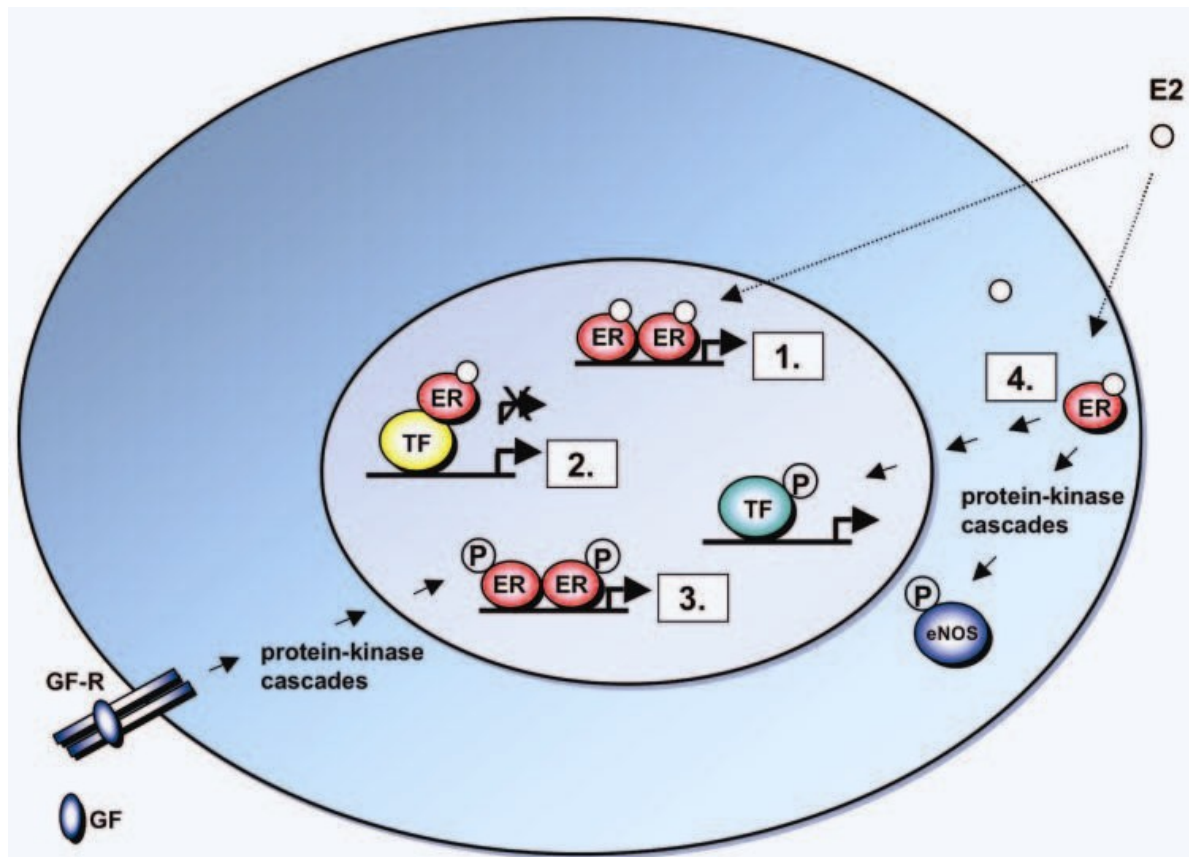


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mechanismen der ER α -Signaltransduktion

1) Klassischer Mechanismus: Nukleäre Östrogen(E2)-gebundene Östrogenrezeptoren (ER) binden direkt an EREs in Zielgen-Promotoren. **2) nicht-klassischer Mechanismus:** Nukleäre E2-gebundene ERs wechselwirken mit Transkriptionsfaktor-Komplexen (TF), welche ihrerseits an Zielgen-Promotoren gebunden sind. **3) liganden-unabhängiger Mechanismus:** Durch Wachstumsfaktoren (GF) aktivierte Proteinkinasen führen zur Phosphorylierung (P) und Aktivierung nukleärer an EREs gebundener ERs. **4) Nicht-genomischer Mechanismus:** Membranständige E2-gebundene ERs aktivieren Kaskaden von Proteinkinasen, welche die Aktivität zytosolischer Proteine, wie z.B. eNOS erhöhen oder die Genexpression durch Phosphorylierung und Aktivierung eines TF verändern.

Aus Björnström und Sjöberg, *Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes* (*Molecular Endocrinology* 19: 833–842, 2005)

1.5 Effekte der Östrogenrezeptoren α und β während des Herzinfarkts

Dass die Effekte von Östrogen nach einem Herzinfarkt auch tatsächlich über die Östrogenrezeptoren vermittelt werden, konnte mithilfe von ER-Antagonisten gezeigt werden. Während die Administration von Östrogen nach einem Herzinfarkt bei ovariectomierten Kaninchen oder Mäusen die Apoptose von Kardiomyozyten und die Größe des Infarkts verringert, führt die gleichzeitige Gabe des ER-Antagonisten ICI182,780 dazu, dass der Effekt von Östrogen blockiert wird (Booth et al., 2003, Patten et al., 2004).

Nachdem also gezeigt werden konnte, dass die Östrogenrezeptoren essentiell für die protektive Wirkung von Östrogen sind, wurde in verschiedenen Studien versucht, zu klären, welche Rolle der Östrogenrezeptor α (ER α) bzw. der Östrogenrezeptor β (ER β) spielt. Hierfür dienten Untersuchungen von Tieren mit genetischer Deletion des ER α (ERKO) bzw. des ER β (BERKO).

In einer I/R-Studie wurde festgestellt, dass weibliche ERKO- und Wildtyp(WT)-Mäuse einen vergleichbaren I/R-Schaden erlitten, während bei weiblichen BERKO-Mäusen die Wiederherstellung der Herzfunktion nach der Reperfusion eingeschränkt war (Gabel et al., 2005). Pelzer und Kollegen konnten anhand von weiblichen BERKO-Mäusen nach einem Myokardinfarkt zeigen, dass trotz vergleichbarer Infarktgrößen die Mortalität acht Wochen nach Infarktinduktion signifikant höher war als bei weiblichen WT-Mäusen. Außerdem waren sowohl klinische als auch biochemische Parameter einer beginnenden Herzinsuffizienz bei BERKO-Mäusen signifikant gesteigert (Pelzer et al., 2005). In einer vergleichbaren Studie, die jedoch nur den Zeitraum von zwei Wochen nach MI untersuchte und zusätzlich ERKO-Mäuse einschloss, zeigte sich, dass BERKO-Mäuse zu signifikant größeren Infarkten neigen als ERKO- bzw. WT-Mäuse, was die protektiven Effekte des ER β unterstreicht (Babiker et al., 2007). Allerdings wurde hier im Gegensatz zu der Studie von Pelzer festgestellt, dass BERKO-Mäuse die geringste Mortalität aller untersuchten Gruppen aufwiesen (Babiker et al., 2007). Da ERKO-Mäuse sich hinsichtlich der Mortalität nicht von Wildtypen unterschieden, schlossen die Autoren, dass im Wesentlichen der ER β die Effekte von Östrogen im infarzierten Herz vermittelt. Demgegenüber stehen andere Studien, die einen protektiven Effekt des ER α beobachteten. So demonstrierten Wang *et al.* (Wang et al., 2006a), dass die Herzfunktion nach I/R in weiblichen ERKO-Mäusen schlechter als bei weiblichen WT-Mäusen und somit ähnlich wie bei männlichen WT- und ERKO-Mäusen war. Dieser Befund untermauert die Ergebnisse von Zhai und Kollegen (Zhai et al., 2000a), die außerdem beobachten, dass der Funktionsverlust im weiblichen ERKO-Herz mit einer schweren Schädigung der Mitochondrien und Myofibrillen einhergeht (Zhai et al., 2000a).

Neben dem Einsatz von KO-Mäusen wurde zur Ermittlung der Rolle des ER α bzw. ER β auch die Wirkung des ER α -selektiven Agonisten PPT bzw. des ER β -selektiven Agonisten DPN auf ovariectomierte Tieren untersucht.

Nikolic und Mitarbeiter (Nikolic et al., 2007) zeigten anhand eines I/R-Experiments, dass die chronische Behandlung mit dem ER β -selektiven Agonisten bei ovariectomierten Mäusen denselben Effekt wie die Gabe von Östrogen auf die Wiederherstellung der Herzfunktion hat. Allerdings wurde hier nicht die Wirkung eines ER α -selektiven Agonisten untersucht. Interessanterweise konnte man aber in einer anderen Studie beobachten, dass nur PPT und Östrogen, nicht jedoch DPN die Infarktgröße verringern kann (Booth et al., 2005). Dieser Befund wurde in weiteren Studien bestätigt (Jeanes et al., 2008, Novotny et al., 2009). Jeanes *et al.* zeigten zudem, dass nur der ER α -selektive Agonist und nicht der ER β -selektive Agonist die Nekrose von Kardiomyozyten sowie die Infiltration von Neutrophilen ins Infarktgebiet vermindert (Jeanes et al., 2008). Später konnte mit Hilfe eines ähnlichen I/R-Experiments, in welchem die Administration der Agonisten in der akut post-ischämischen Phase vorgenommen wurde, nachgewiesen werden, dass sowohl der ER α - als auch der ER β -selektive Agonist zur Wiederherstellung der Herzfunktion beiträgt (Vornehm et al., 2009).

Zusammenfassend konnte wegen der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse in diesen Studien nicht nachgewiesen werden, dass einer der beiden Östrogenrezeptoren allein für die protektiven Effekte von Östrogen bei kardiovaskulären Erkrankungen verantwortlich ist. Scheinbar haben sowohl der ER α als auch der ER β eine Funktion. Es wurde allerdings spekuliert, dass kurzfristige Effekte von Östrogen über den ER α vermittelt werden, während der ER β eher für langfristige Effekte verantwortlich ist (Murphy and Steenbergen, 2007).

1.6 Das Mausmodell ER α OE

Seit Jahren versuchen Wissenschaftler, die Rolle der Östrogenrezeptoren ER α und ER β nach einem Herzinfarkt aufzuklären. Trotz intensiver Forschung sind die genauen molekularen Mechanismen bis heute nur teilweise aufgeklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des ER α nach einem Herzinfarkt zu untersuchen. Allerdings wird hierfür ein neuer Versuchsansatz gewählt, der es erlaubt, die Funktion des ER α ausschließlich im Herzen zu verändern ohne dass andere Organe hiervon betroffen sind.

Sowohl der Einsatz von ERKO-Mäusen als auch die Administration von ER α -selektiven Agonisten in ovariectomierten Tieren haben den Nachteil, dass die Effekte des ER α im gesamten Körper verändert werden. Der ER α spielt in fast allen Organen des Körpers eine Rolle. Neben seiner Expression in den Sexualorganen, ist er u. a. auch im Gehirn, den Knochen, den Muskeln oder den Zellen des Immunsystems zu finden (Pierdominici et al., 2010, Wend et al., 2012). Wird ein Versuchsansatz gewählt, der die Funktion des ER α systemisch verändert, kann somit die Reproduktivität, das Verhalten, das Muskel- und Knochenwachstum und die Funktion von Immunzellen beeinflusst werden. Zum Beispiel migrieren Zellen des Immunsystems nach einem Herzinfarkt zur Wundheilung zum Herzen.

Die Veränderung der ER α -Funktion könnte möglicherweise die Differenzierung und die Wanderung verschiedener Immunzellen zum infarzierten Herzen beeinflussen (Thurmond et al., 2000, Shindo et al., 2013). Um solche Nebeneffekte auszuschließen und die Effekte des ER α nur im Herzen zu untersuchen, bedienen wir uns eines Mausmodells mit Kardiomyozyten-spezifischer ER α -Überexpression (ER α OE).

1.7 Ziele dieser Arbeit

Mit Hilfe des neuartigen ER α OE-Mausmodells soll in dieser Arbeit die Rolle des ER α nach einem Herzinfarkt analysiert werden. Da in oben genannten Studien mit ERKO-Mäusen gezeigt wurde, dass das Fehlen des ER α zur Verschlechterung des Zustands nach einem Herzinfarkt führen kann, wird geprüft, ob eine ER α -Überexpression einen protektiven Effekt hat. Im Vergleich mit genetisch unveränderten Wildtyp-Mäusen soll geklärt werden, ob und inwieweit die ER α OE-Mäuse von der Überexpression des ER α profitieren können. Um mögliche Geschlechterunterschiede beobachten zu können, werden sowohl männliche als auch weibliche Tiere in die Experimente eingeschlossen.

Zur Bestätigung der Kardiomyozyten-spezifischen ER α -Überexpression soll die Proteinexpression des ER α im Herzen und anderen Organen in ER α OE- und WT-Mäusen analysiert werden. Nach Induktion des Herzinfarkts wird das Überleben im Zeitraum der folgenden zwei Wochen protokolliert, um zu überprüfen, ob die ER α -Überexpression zu einem besseren Überleben nach einem Herzinfarkt führt. Am 14. Tag nach Infarktinduktion werden die Herzfunktion und die morphologischen Veränderungen des linken Ventrikels mittels Echokardiographie untersucht. Hiermit soll geklärt werden, ob die Herzfunktion der ER α OE-Mäuse gegenüber WT-Mäusen nach MI besser aufrechterhalten wird und ob die Infarktgröße durch die ER α -Überexpression verringert werden kann. Anschließend sollen anhand des entnommenen Herzgewebes Untersuchungen auf Genexpressions- und Proteinebene vorgenommen werden. Hierbei sollen Gene untersucht werden, die mit Hypertrophie, Fibrose, Ca²⁺-*Signaling* und der Mitochondrienfunktion assoziiert sind. Da gezeigt wurde, dass ERKO-Mäuse nach I/R zerstörte Mitochondrien aufweisen, soll geprüft werden, ob der ER α die Mitochondrienmorphologie und -funktion nach einem Herzinfarkt beeinflussen kann. Um dies zu analysieren, werden Herzbiopsien elektronenmikroskopisch untersucht und die Atmungsaktivität von Herzmuskelfasern gemessen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Laborausstattung

ELISA Reader <i>Benchmark Plus</i>	BIO-RAD, München, Deutschland
Elektrophoresekammer <i>Horizon</i> [®] 11-14	GIBCO, BRL, USA
Entwicklermaschine <i>Curix60</i>	Agfa, Deutschland
FastPrep apparatus FP120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lichtmikroskop <i>Axiostar Plus</i>	Zeiss, Jena, Deutschland
Oxygraph System	Hansatech Instruments, H. Saur Labordedarf, Reutlingen, Deutschland
PCR-Gradienten-Cycler <i>Mastercycler Gradient</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator 3033	GFL, Burgwedel, Deutschland
TAQ-Man <i>ABI 7000</i>	Applied Biosystems, Warrington, GB
Taq Man 7300 RealTime PCR System	Applied Biosystems, Warrington, GB
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Vis-Geldokumentationsanlage <i>Gel Imager</i>	INTAS, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Western-Blot-Apparaturen	BIO-RAD, München Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0.2, 0.5, 1.5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Röntgenfilme	Fujifilm Europe, Düsseldorf, Deutschland
Whatman-Papier	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB

2.1.2 Geräte und Materialien für Tierexperimente

Ketaminhydrochlorid-Xylazinhydrochlorid (K113)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mouse Ventilator Minivent Type 845	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Stereomikroskop Leica MZ 6	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Heizkissen Sanitas SHK 10, Typ P9	Hans Dinslage, Uttenweiler, Deutschland
Infrarotlampe IR 11, 150 W	Petra-Electronic, Burgau, Deutschland
Vevo 770 High-Resolution Imaging System	Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada
RMV 707-Schallkopf	Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada
Vevo Mouse Handling Table	Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada
Präzisions-Taschenschiebelehre Vernier Caliper	Conrad, Berlin, Deutschland
Operationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Operationsbesteck	Heiland, Hamburg, Deutschland
Nahtmaterial	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Venenverweilkanüle	BD Venflon Pro, Fa. Becton Dickinson
Enthaarungscreme	Veet, Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Carprofen (Rimadyl®)	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
0,9% NaCl-Lösung	Braun, Melsungen Deutschland
Kaltlichtlampe KL 1500 LCD	Schott, Mainz, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbott GmbH&Co KG, Wiesbaden, Deutschland
Ultraschallgel Aquasonic	Parker, Fairfield, NY, USA
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland

2.1.3 Geräte und Materialien für die Histologie

Gewebeeinbettautomat Shandon Citadel 1000	Thermo Electron Cooperation, Erlangen, Deutschland
Paraffin-Ausgießstation EC 350	Microm International, Walldorf, Deutschland
Mikrotom HM 325	Microm International, Walldorf, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Einbettkassette Histosette II	Simport Plastics Ltd., Beloeil, QC, Kanada
Deckgläser, 24 x 50mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin Y Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Weigerts Hämatoxylinlösung A	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einschlussmedium Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Acrylamid 30% [RotiphoreseGel]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Adenosin-diphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Albuminstandard 2mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete [Proteinaseinhibitor]	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R-250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Creatinphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DEPC-H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynukleotide (dCTP, dUTP, dATP, dGTP)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka, Steinheim, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Fluka, Steinheim, Deutschland
Einschlussmedium VectaMount™	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Formalinlösung mit 4% Formaldehyd [Roti-Histofix]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GelRed*	Biotium, Hayward, CA, USA
L-(-)-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lysis matrix D, ¼ Ceramic Sphere	MP-Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-(-)-Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mayers Hämatoxylin Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

MES-Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na ₂ ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-MES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Neoclear	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P-40	Roche, Mannheim, Deutschland
Paraffin Typ 6 und Typ 9	Microm International, Walldorf, Deutschland
Phosphostop [Phosphataseinhibitor]	Roche, Mannheim, Deutschland
Ponceau S-Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Probenpuffer 4x für Proteine [Roti-Load1]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinstandard	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNA-Bee	Tel-Test, Friendswood, TX, USA
Rotenon	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Succinat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS (phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, GB
Taurin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TBE-Puffer 10x [Rotiphorese]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween20 (Polysorbat)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Antikörper

ER α (G-20)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
ER α (MC-20)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
phospho-ER α (pER α (serin 118)-R)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, GB
anti-Maus IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

2.1.6 Reagenziensätze (Kits)

Pierce BCA Protein Assay

Thermo Fisher Scientific, Rochford, IL, USA

Taq-DNA-Polymerase Kit

PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Applied Biosystems, Warrington, GB

2.1.7 Puffer und Lösungen

2.1.7.1 Messung der mitochondrialen Respiration

ADP-Lösung:

Komponenten (MW [g/mol])	Menge	Konzentration
ADP [501,3]	250,65 mg	0,5 M
5M KOH	225 µl	1,125 M
3M MgCl ₂	50 µl	150 mM
ddH ₂ O	ad 1 ml	

Cytochrom C-Lösung:

Komponenten	Menge	Konzentration
Cytochrom C (12,4)	39 mg	1,6 mM
ddH ₂ O	ad 4 ml	

Glutamat-Lösung:

Komponenten (MW [g/mol])	Menge	Konzentration
L-Glutamat [169,1]	1,691 g	1 M
ddH ₂ O	ad 10 ml	

KCl-Puffer:

Komponenten	Menge	Konzentration
KCl (3M)	8,3 ml	125 mM
HEPES	953 mg	20 mM
Mg-Acetat	128 mg	3 mM
EGTA	30 mg	0,4 mM
KH ₂ PO ₄ (100 mM)	10 ml	5 mM
DTT (100 mM)	6 ml	0,3 mM
ddH ₂ O	ad 200 ml	

pH 7,1 mit KOH einstellen (22°C)

Krebs-Puffer:

Komponenten	Menge	Konzentration
NaCl	6,9 g	118 mM
KCl	350 mg	4,7 mM
MgSO ₄	296 mg	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	163 mg	1,2 mM
NaHCO ₃	2,1 g	25 mM
ddH ₂ O	ad 1 l	

Malat-Lösung:

Komponenten (MW [g/mol])	Menge	Konzentration
L-Malat [134,09]	1,3409 g	1 M
ddH ₂ O	ad 10 ml	

Natriumazid-Lösung:

Komponenten (MW [g/mol])	Menge	Konzentration
NaN ₃ [65,01]	650,01 mg	1 M
ddH ₂ O	ad 10 ml	

R₀-Lösung (Waschen nach Saponieren):

Komponenten	Menge	Konzentration
CaK ₂ EGTA (100 mM)	13,85 ml	2,77 mM
K ₂ EGTA (100 mM)	36,15 ml	7,23 mM
MgCl ₂ (500 mM)	1,38 ml	1,38 mM
K ₂ HPO ₄ (1 M)	1,5 ml	3 mM
Imidazol (1 M)	10 ml	20 mM
Taurin (1 M)	10 ml	20 mM
DTT (10 mM)	25 ml	0,5 mM
K-MES (1 M)	45 ml	90 mM
Na-MES (1 M)	5 ml	10 mM
ddH ₂ O	ad 500 ml	

pH 7,1 mit KOH einstellen (22°C)

Rotenon-Lösung:

Komponenten (MW [g/mol])	Menge	Konzentration
Rotenon [394]	1,97 mg	0,5 mM
ddH ₂ O	ad 10 ml	

Saponin-Lösung:

Komponenten (MW [g/mol])	Menge	Konzentration
Saponin	0,25 mg	2,5 mg/ml
ddH ₂ O	ad 100 µl	

S-Lösung (Fasern und Saponieren):

Komponenten	Menge	Konzentration
CaK ₂ EGTA (100 mM)	13,85 ml	2,77 mM
K ₂ EGTA (100 mM)	36,15 ml	7,23 mM
MgCl ₂ (500 mM)	6,56 ml	6,56 mM
Na ₂ ATP (50 mM)	57 ml	5,7 mM
Creatinphosphat (100 mM)	75 ml	15 mM
Imidazol (1 M)	10 ml	20 mM
Taurin (1 M)	10 ml	20 mM
DTT (10 mM)	25 ml	0,5 mM
K-MES (1 M)	25 ml	5 mM
ddH ₂ O	ad 500 ml	

pH 7,1 mit KOH einstellen (22°C); Zum Saponieren der Muskelfasern wird die S-Lösung mit Saponin-Lösung im Verhältnis 50:1 versetzt.

Succinat-Lösung:

Komponenten (MW [g/mol])	Menge	Konzentration
Succinat (270,1)	2,701 g	1 M
ddH ₂ O	ad 10 ml	

pH 7,1 mit 37% HCl einstellen (22°C)

2.1.7.2 DNA-Isolierung

Lysispuffer für Gewebeverdau:

Komponenten	Stocklösung	Menge für 5 ml	Konzentration
Tris, pH 7.5	1 M	250 µl	50 mM
NaCl	1 M	500 µl	100 mM
EDTA	0.5 M	1000 µl	100 mM
SDS	10%	500 µl	1%
ddH ₂ O		2750 µl	

2.1.7.3 Proteinextraktion

Lysispuffer:

Komponenten	Stocklösung	Menge für 10ml	Konzentration
Tris, pH 7.5	1 M	100 µl	10 mM
NaCl	5 M	280 µl	140 mM
EDTA	0.5 M	20 µl	1 mM
Glycerin	100%	2,5 ml	25%
SDS	10%	500 µl	0,5%
Nonident P-40	100%	50 µl	0,5%
DTT	100 mM	500 µl	5 mM
PMSF	50 mM	200 µl	1 mM
Complete	25x	400 µl	1x
NaF	1 M	10 µl	1 mM
Na ₃ VO ₄	100 mM	100 µl	1 mM
Phosphostop (1x)	10x	1 ml	1x
ddH ₂ O		4340 µl	

2.1.7.4 Western-Blot

SDS-Polyacrylamid-Trenngele (15ml):

Komponenten	8%	10%	12%
ddH ₂ O	6,9 ml	5,9 ml	4,9 ml
30% PAA (w/v)	4 ml	5 ml	6 ml
1,5M Tris, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
10% SDS (w/v)	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
10% APS (w/v)	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	9 µl	6 µl	6 µl

SDS-Polyacrylamid-Sammelgel (6ml):

Komponenten	5%
ddH ₂ O	4,1 ml
30% PAA (w/v)	1 ml
1,5M Tris, pH 6,8	750 µl
10% SDS (w/v)	60 µl
10% APS (w/v)	60 µl
TEMED	6 µl

5x Elektrophorese-Puffer:

Komponenten (MW [g/mol])	Gewicht/5l	Konzentration (5x)	Konzentration (1x)
Tris [121,14]	75,5 g	625 mM	125 mM
Glycin [75,07]	470 g	6,25 M	1,25 M
10% SDS (w/v)	250 ml	0,5%	0,1%
ddH ₂ O	ad 5000 ml		

5x Transfer-Puffer:

Komponenten (MW [g/mol])	Gewicht/5l	Konzentration (5x)	Konzentration (1x)
Tris [121,14]	72,73 g	600 mM	120 mM
Glycin [75,07]	345,95 g	4,6 M	920 mM
ddH ₂ O	ad 5000 ml		

Gebrauchsfertigen Puffer mit Methanol und ddH₂O im Verhältnis 1:1:3 ansetzen

Färbelösungen:

Ponceau Rot	Coomassie Brilliant Blue R-250	Entfärbelösung
0,1% Ponceau S (w/v) 5% Essigsäure (v/v)	0,25% w/v Coomassie Brilliant Blue 45% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)	40% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)

Waschlösungen:

TBS (10x)	TBS-T (1x)	Stripping-Puffer
50mM Tris-HCl (pH 7,6) 10mM NaCl	TBS (1x) 0,1% [v/v] Tween 20	1,87g Glycin 100ml 10% SDS [w/v] Ad 1l mit ddH ₂ O.

Blocking-Puffer:

5% Magermilch	3% BSA
5% (w/v) fettfreies Magermilchpulver 1x TBS-T	3% (w/v) BSA 1x TBS-T

2.1.8 Primer

	Primersequenz (5'→3')
ATP5K	Fw: TCAGGTCTCTCCACTCATCAAGT Rev: TTCTTTTCTCCGCTGCTAT
ATP2A2 (Serca2a)	Fw: TGAGTTCCTTCAGTCCTTTGATG Rev: GGCAATCCCGATTTTCAGAT
Col1	Fw: TGTAACACCCCAGCGAAGAA Rev: CTGAGTTGCCATTTCCCTTGA
Col3	Fw: CTCACCCTTCTTCATCCCCTCTTA Rev: ACATGGTTCTGGCTTCCAGACAT
Cox1 (mtDNA)	Fw: TGAAACCCCCAGCCATAACACAGT Rev: TTGGGTCCCCTCCTCCAGCG
Cox5a	Fw: GTCAGCCTCAGCCAGTGC Rev: TAGCAGCGAATGGAACAGAC
HPRT	Fw: TGTTGTTGGATATGGCCTTG Rev: TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
Mef2a	Fw: AGAGTTTTCTGCAAGAATCAAACA Rev: TCCAATCTCCTAATGCATCGT
MMP2	Fw: TACGATGATGACCGGAAGTG Rev: GGAAGTTCTTGGTGTAGGTG
Myh6	Fw: GCCAAGACTGTCCGGAATGA Rev: TGGAAGATCACCCGGGACTT
Myh7	Fw: CAAAGGCAAGGCAAAGAAAG Rev: TCACCCCTGGAGACTTTTGTG
ND1 (mtDNA)	Fw: AGCCTGACCCATAGCCATAA Rev: TTCTCCCTTCTGTCAGGTCGAA
NPPA	Fw: CCTGTGTACAGTGCGGTGTC Rev: CCTCATCTTCTACCGGCATC
NPPB	Fw: GCACAAGATAGACCGGACG Rev: CAGGCAGAGTCAGAACTGGA
Nrf1	Fw: AGCACCTTTGGAGAATGTGGT Rev: TGGGATAAATGCCCGAAGCTG
Nrf2	Fw: CATGATGGACTTGGAGTTGC Rev: CCTCCAAAGGATGTCAATCAA
PGC1 α	Fw: GAAAGGGCCAAACAGAGAGA Rev: GTAAATCACACGGCGCTCTT
PLN	Fw: ACGATCACCGAAGCCAAG Rev: TGGTCAAGAGAAAGATAAAAAGTTGA
18s rRNA (mtDNA)	Fw: CCTGAGAAACGGCTACCAT Rev: TTCCAATTACAGGGCCTCGA

Das Primerdesign wurde mit Hilfe der „Universal Probe Library Essay Design“-Software (Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com) vorgenommen. Hierbei wurden Intron-überspannende Primer gewählt, um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden.

Alle Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Brahms GmbH, Henningsdorf, Deutschland) bezogen.

2.1.9 Computerprogramme

Adobe Photoshop	Adobe Systems, München, Deutschland
Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems, München, Deutschland
AxioVision Rel.4.6	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Endnote 9.0	Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ	NCBI/National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Microplate Manager 5.2	BIO-RAD, München, Deutschland
Microsoft Excel 2003	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2003	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 2003	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Oxygraph Plus Software	Hansatech Instruments, H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
TAQ-Man Software ABI 7300	Applied Biosystems, Warrington, GB
Vevo 770	Visual Sonics, Toronto, Ontario, Kanada

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.1.1 Generierung der Mauslinie mit herzspezifischer ER α -Überexpression

Die Generierung der ER α OE-Mäuse wurde von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe um Dr. Frederic Jaisser (INSERM, Paris), durchgeführt. Als Modell diente das sog. tTA (*tetracycline controlled transactivator*)- bzw. Tet-Off-System, welches ursprünglich von Gossen und Bujard entwickelt wurde (Gossen and Bujard, 1992) und bisher weite Verbreitung bei der Generierung gewebespezifisch und zeitlich gesteuerter Expression von Zielgenen in der Maus gefunden hat.

Das tTA-System basiert auf regulatorischen Elementen des Tetrazyklin-Resistenz-Operons aus *E. coli*-Bakterien, in welchen die Transkription von Resistenz-vermittelnden Genen durch den Tetrazyklinrepressor (TetR) reguliert wird. Durch Fusion des TetR mit der aktivierenden Domäne eines im Herpesvirus synthetisierten Proteins, wurde ein Tetrazyklin-gesteuerter Transaktivator (tTA) geschaffen. Dieser stimuliert die Transkription vom Promotor des ebenfalls modifizierten *tet*-Operators (Tet-O).

Wird Expression des tTA-Proteins durch einen gewebespezifischen Promotor reguliert, kann die Expression eines mit dem Tet-Operator verbundenen Zielgens in einem bestimmten Gewebe stimuliert werden. Der Name „Tet-Off“ beruht darauf, dass durch Zugabe des Tetrazyklin-Analogons Doxyzyklin die Konformation des tTA-Proteins verändert wird. Dadurch kann das tTA-Protein nicht mehr an die DNA binden und somit wird die Transkription des Zielgens unterbunden (Ramos et al., 2005) (vgl. Abb. 2).

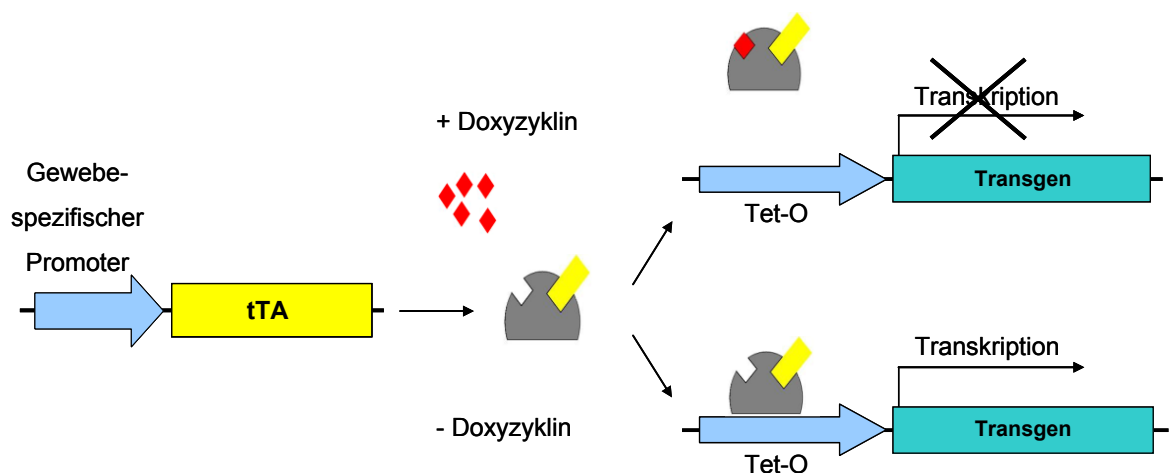


Abbildung 2: Prinzip des tTA-Systems: Die Bindung des gewebespezifisch exprimierten tTA-Proteins an den Tet-Operator (Tet-O), welcher als Promotor vor das zu exprimierende Zielgen geschaltet ist, kann durch Zugabe von Doxyzyklin unterbunden werden

Das tTA-System bedient sich zweier transgener Mausstämme, welche zum einen gewebespezifisch den Transaktivator tTA und zum anderen das Zielgen unter Kontrolle

eines tTA-responsiven Promotorelements exprimieren. Im Fall dieser Doktorarbeit exprimiert die erste sog. *Transactivator*-Maus den Transaktivator tTA unter Kontrolle des α -myosin heavy chain (α MHC)-Promotors (α MHC-tTA-monotransgen), welcher ausschließlich im Herzen aktiv ist. Die zweite sog. *Responder*-Maus exprimiert den ER α unter Kontrolle des tTA-responsiven Promotors (ER α -monotransgen). Eine doppelt transgene Maus, die durch Verpaarung von *Transactivator*- und *Responder*-Maus entsteht, überexprimiert den ER α spezifisch im Herzen (vgl. Abb. 3).

Transactivator mouse

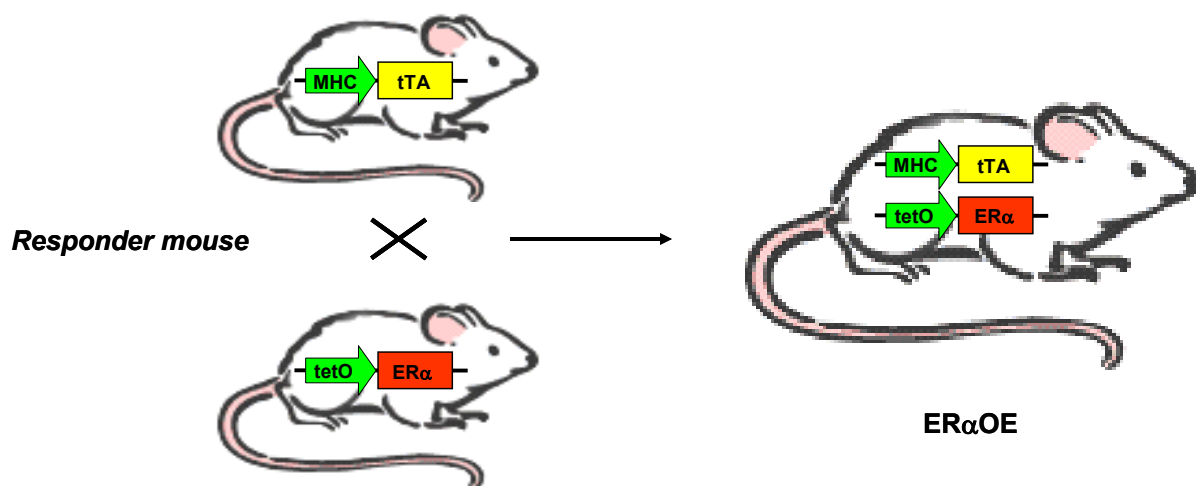


Abbildung 3: Generierung einer doppelt transgenen Maus, die den Östrogenrezeptor α spezifisch im Herz überexprimiert

2.2.1.2 Züchtung und Haltung

Alle durchgeführten Tierexperimente erfolgten gemäß den gesetzlichen Bestimmungen und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSO, Berlin) unter den Aktenzeichen L0088/08, O0341/06 und G0369/08 genehmigt. Zunächst wurden die Tiere per Embryotransfer von Paris nach Berlin transferiert und danach über mehrere Generationen bis zum Versuchsbeginn gezüchtet. Die Tiere wurden auf einem B6D2F1-Hintergrund, einer Kreuzung aus C57/Bl6- und DBA/2-Mäusen, gehalten. Die ER α -monotransgenen Mäuse wurden ursprünglich auf einem FVB/N-Hintergrund generiert.

Die Züchtung und Haltung aller verwendeten Tiere erfolgte in den tierexperimentellen Einrichtungen der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM, Berlin) und in denen des Bundesinstituts für Risikoforschung (BfR, Berlin). Im Alter von ca. 5 Wochen wurden den Tieren Schwanzbiopsien entnommen und diese zur Genotypisierung ins *Center for Cardiovascular Research* (CCR, Berlin) geschickt. Im Alter von 9-10 Wochen wurden die Tiere ins CCR transferiert. Dort wurden die Tiere bei einem 12h-Hell-Dunkel Rhythmus für wenigstens drei Tage bei einer Gruppengröße von maximal fünf Tieren in Typ-II-Käfigen (Grundfläche 440 cm²) gehalten, bevor sie für die Experimente eingesetzt wurden. Die Tiere

erhielten eine speziesspezifische Standarddiät und Doxzyklin-freies Leitungswasser nach Bedarf.

2.2.1.3 Versuchsgruppen

Das Tierexperiment umfasste insgesamt 328 Mäuse, wobei die Mäuse gemäß nachfolgender Tabelle in die unterschiedlichen Versuchsgruppen aufgeteilt waren:

Tabelle 1: Versuchsgruppen I-XVI unterteilt nach Geschlecht, Genotyp und erfolgtem Eingriff

Versuchsgruppe	Geschlecht	Genotyp	Operation	Gruppengröße
I	w	WT	sham	14
II	m	WT	sham	14
III	w	WT	MI	23
IV	m	WT	MI	38
V	w	ER α -monotransgen	sham	14
VI	m	ER α -monotransgen	sham	14
VII	w	ER α -monotransgen	MI	23
VIII	m	ER α -monotransgen	MI	23
IX	w	α MHC-tTA-monotransgen	sham	14
X	m	α MHC-tTA-monotransgen	sham	14
XI	w	α MHC-tTA-monotransgen	MI	23
XII	m	α MHC-tTA-monotransgen	MI	23
XIII	w	α MHC-tTA/ER α (ER α OE)	sham	14
XIV	m	α MHC-tTA/ER α (ER α OE)	sham	14
XV	w	α MHC-tTA/ER α (ER α OE)	MI	32
XVI	m	α MHC-tTA/ER α (ER α OE)	MI	31
Gesamt				328

2.2.1.4 Infarktinduktion und postoperative Versorgung

Das Modell zur Infarktinduktion bei der Maus wurde zuerst von Michael *et al.* etabliert (Michael et al., 1995). Hierbei wird die linke Koronararterie kurz unterhalb des linken Vorhofs okkludiert (vgl. Abb. 4). Obwohl der zeitliche Ablauf der Prozesse nach Infarktinduktion bei Mäusen naturgemäß schneller als beim Menschen ist, werden auf diese Weise Infarkte induziert, die hinsichtlich der Lokalisation im Herzen vergleichbar mit Infarkten im menschlichen Herzen sind (Michael et al., 1995).

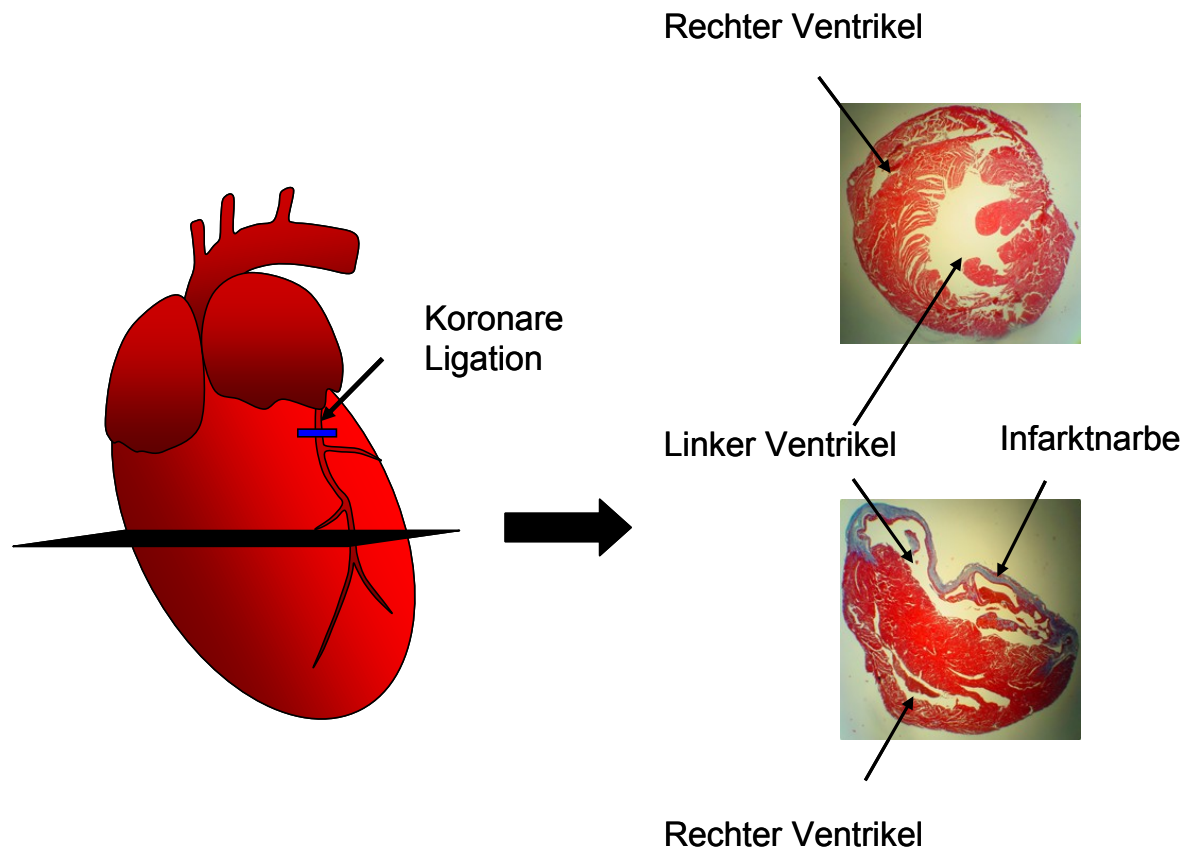


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Platzierung der koronaren Ligatur im Mauserzen (links) und Querschnitt durch das Herz einer scheinoperierten (rechts oben) und einer infarzierten Maus (histologische Färbung zur Darstellung der Infarkttnarbe, rechts unten).

Zur Feststellung der nötigen Dosierung des Narkose- und Schmerzmittels wurden die Tiere zuerst gewogen. Um eine optimale Schmerztherapie schon in der Aufwachphase zu gewährleisten, wurden vor der Operation 5 mg/kg KG Rimadyl intraperitoneal injiziert (Carprofen-Stocklösung 1:100 mit steriler 0,9% [w/v] NaCl-Lösung verdünnt).

Für die Anästhesie wurde ein intraperitoneal zu applizierendes Ketamin-Xylazin-Kombinationspräparat der Firma Sigma-Aldrich verwendet (K113, 800mg Ketaminhydrochlorid und 120 mg Xylazinhydrochlorid gelöst in 10 ml destilliertem Wasser). Um die vom Hersteller angegebene Dosierung von 80mg/kg KG Ketaminhydrochlorid und 12mg/kg KG Xylazinhydrochlorid verabreichen zu können, wurde eine Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung (1:10) vorgenommen und die Dosierung nach folgender Formel berechnet: $K113 (1:10) \text{ ml} = 0,0071 \times \text{KG (g)} + 0,1714$. Mit dieser Dosierung wurde in der Regel nach spätestens 7 Minuten eine ungefähr 50 Minuten anhaltende Narkose erreicht.

Als Indikator für die Narkosetiefe diente der Zehenreflex. Hierbei wurde mit einer Pinzette leicht in die Zehen eines Hinterbeins gekniffen. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde das Bein nicht mehr angezogen. Bestand der Reflex auch nach mehr als 7 Minuten wurde die Narkose durch eine weitere Applikation von K113 (20-30 % der Initialdosis) vertieft. Nach

ungefähr 3 Minuten konnte erneut getestet werden. War der Reflex verschwunden, konnte die Maus ausgebunden und intubiert werden (Tarnavski et al., 2004).

Als Operationstisch diente eine mobile Kunststoffplatte (Maße: 30 x 20 x 0,5 cm), die, um eine Unterkühlung des Tierkörpers zu verhindern, auf einem Wärmekissen lag. Zur Intubation wurde das Tier auf den Rücken gelegt und mit einem Stück Klebeband hinter den oberen Schneidezähnen möglichst randnah und in Richtung Operateur weisend auf der Platte fixiert. Eine flexible Kaltlichtquelle, die den Halsbereich anstrahlt, wurde verwendet, um die Luftröhre deutlich von der Speiseröhre unterscheiden zu können. Hierbei war das Lumen der Luftröhre als ein helles sich öffnendes und schließendes Dreieck im Rachen deutlich sichtbar. Zuerst wurde die Zunge ein Stück herausgezogen und dann mit einer gebogenen Arterienklemme an den Unterkiefer gedrückt, um den Rachenbereich einsehen zu können. Der Tubus in Form einer 22 gauge Venenverweilkanüle (Braunüle) wurde vorsichtig in die hell erleuchtete Trachea vorgeschoben ohne die Luftröhre bzw. die Lunge zu verletzen. Der Tubus wurde anschließend mit der Beatmungsmaschine verbunden. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft bei 220 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 200 µl. Bei erfolgreicher Intubation war ein deutliches Heben und Senken des Brustkorbs sichtbar.

Nach der Intubation wurde die Maus vollständig fixiert. Hierzu wurde erst die Befestigung des linken Vorderbeines gelöst, dann das Tier etwas auf die rechte Seite gedreht und die beiden Hintergliedmaßen auf der rechten Körperseite fixiert. Ohne Zug wurde als letztes das linke Vorderbein wieder links des Körpers befestigt. Diese Seitenlage bot sich an, da sich der Zugang zum linken vierten Interkostalraum (ICR) obenauf und nicht seitlich befindet und somit im Sichtbereich des Mikroskops lag (Tarnavski et al., 2004).

Vor der Operation wurde das Operationsfeld mit Enthaarungscreme enthaart und mit Polyvidonjod desinfiziert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten mit Hilfe eines Mikroskops. Der Hautschnitt erfolgte entlang einer imaginären ca. 1cm langen Linie, die von kranial nach kaudal auf halber Höhe zwischen Brustbein und Rückenlinie zieht. Die Haut wurde mit einer Präparierschere eröffnet und von der darunter liegenden Faszie und Muskulatur stumpf freipräpariert. Der nun sichtbare *musculus pectoralis major* wurde mit einer geraden und einer gebogenen anatomischen Pinzette von dem darunter liegenden *musculus pectoralis minor* stumpf freipräpariert. Anschließend wurde der Muskelbauch, mit dem Ziel ein Fenster über dem vierten ICR zu schaffen, mit einem 6.0 Faden kranioventral ziehend fixiert. Mit demselben Verfahren wurde der *musculus pectoralis minor* freipräpariert und in die entgegengesetzte Richtung, d.h. nach kaudodorsal, verlagert. Mit einer Mikroschere wurde nun der ICR unter Schonung der darunter liegenden Lunge und des Herzbeutels auf einer Länge von ca. 6-8 mm eröffnet. Hierbei wurde darauf geachtet, die innen am Brustbein entlanglaufende *arteria thoracica interna* nicht zu beschädigen, da dies erhebliche Blutungen

hervorgerufen hätte. Der ICR wurde wie das Fenster in der Muskulatur mit an den Rippen und am Tisch fixierten Fäden auf eine Breite von ca. 6-8 mm gespreizt. Nach Eröffnung des Herzbeutels ergab sich ein direkter Blick auf das linke Herzohr und die linke Kammer.

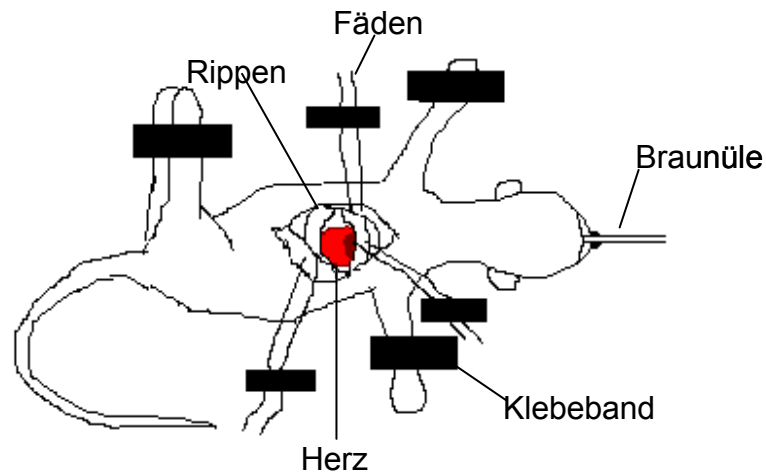


Abbildung 5: Schematische Darstellung des operativen Zugangs zum Herzen und zur linken anterior deszendierenden Koronararterie. Die Muskeln, die Haut und die Rippen werden mit Hilfe von Fäden positioniert. Die Maus ist intubiert.

Da die zu ligierende linke anterior deszendierende Koronararterie (LAD) nicht oberflächlich verläuft und so nicht zu sehen ist, wurde die Ligatur 1-2 mm unterhalb der Herzohrspitze durchgeführt. Mit einer Nadel-Faden-Kombination wurde ein 7-0 nicht-resorbierbarer Faden durchs Myokard geführt und mit 3 Knoten festgezogen. Als Beweis einer korrekt durchgeführten Ligatur der LAD konnte ein deutliches Ausbleichen des sichtbaren Anteils der linken Ventrikelwand beobachtet werden.

Der Herzbeutel wurde anschließend wieder über dem Herzen platziert und die an den Rippen befestigten Fäden gelöst. Zum Verschluss des Schnittes zwischen den Rippen wurde eine Heftnaht mit 6-0 nicht-resorbierbarem Seidenfaden gesetzt. Vor Platzierung des Heftes wurde die Lunge durch kurzes Abdrücken der abführenden Luftleitung wieder aufgeblasen und als Platzhalter zur Verhinderung eines Pneumothorax lauwarme NaCl-Lösung in die verbliebene Thoraxöffnung injiziert bis sie wieder herauslief. Nachdem der Thorax geschlossen war, wurde die Muskulatur aus der Fixierung gelöst und reponiert. Die Haut wurde mit 6-0 nicht-resorbierbarem Seidenfaden in einer fortlaufenden Naht verschlossen und mit Polyvidonjod desinfiziert.

Die künstliche Beatmung wurde solange fortgesetzt, bis die Tiere erkennbar aus der Narkose erwacht waren und Reflexe zeigten. Dann wurde die Maus extubiert, woraufhin nach einem kurzen Moment die Spontanatmung auf Grund des ansteigenden CO₂-Gehaltes im Blut wieder einsetzte. Um eine Hypothermie zu vermeiden, wurde das Tier während der

Aufwachphase in einem Einzelkäfig unter Rotlichtbestrahlung (Temperatur ~25-30 °C) belassen. Die analgetische Folgebehandlung wurde täglich über einen Zeitraum von einer Woche durchgeführt und entsprach der Initialdosis.

2.2.1.5 Sham-Operation

Der Ablauf der Sham(Schein)-Operation entsprach dem zur Infarktinduktion eingesetzten Verfahren mit Ausnahme der Ligation der LAD. Daher wurde der Brustkorb nach Eröffnung des Herzbeutels ohne weitere Eingriffe wieder verschlossen. Anästhesie und Analgesie erfolgten wie oben beschrieben.

2.2.1.6 Echokardiographie

Bei dem verwendeten Gerät handelte es sich um ein Ultraschallgerät der Firma Visual Sonics, welches mit einem 20-55 MHz-Schallkopf ausgestattet war. Alle operierten Tiere wurden einen Tag vor der Operation sowie 14 Tage danach echokardiographisch untersucht. Vor jeder Ultraschall-Untersuchung wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Anschließend wurden sie zur Inhalationsanästhesie in einer Narkosebox mit Isofluran begast. Zur Narkoseeinleitung enthielt das Sauerstoff-Isofluran-Gemisch 3ppm Isofluran, zur Aufrechterhaltung 1,5ppm. Sobald die Narkose wirkte und das Tier sich nicht mehr bewegte, wurde es auf einer beheizten Platte (~38°C), die über Elektroden für die Gliedmaßen verfügt, auf dem Rücken liegend mit Klebestreifen fixiert und der Brustkorb mit Enthaarungscreme von Fell befreit. Das Narkosegas wurde während der Untersuchung über eine trichterförmige Atemmaske zugeführt. Es wurden sog. B-Mode-Aufnahmen angefertigt.

2.2.1.6.1 B-Mode (Brightness-Mode)

Im B-Mode wurde die „parasternale lange Achse“ des Herzens dargestellt. Dadurch werden der linke Ventrikel und dessen Übergang in die Aorta sowie der linke Vorhof dargestellt (Abb. 6). In dieser Ebene wurden die Längsachse und der Flächeninhalt des linken Ventrikels sowohl in der Diastole als auch der Systole gemessen. Aus diesen Werten wurden die Ejektionsfraktion (EF) und die linksventrikuläre Masse (LVM) berechnet (Formeln siehe unten).

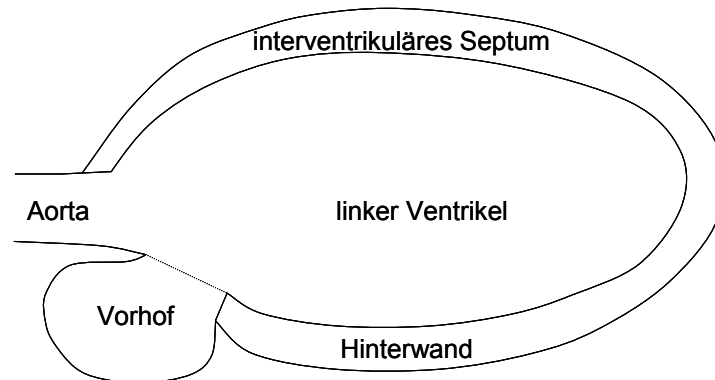


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Strukturen, die in der Aufnahme der parasternalen langen Achse sichtbar sind

Um Aufnahmen mit einer höheren Kontraststärke aufzunehmen, wurde der sog. EKV-Mode (*ECG-Gated Kilohertz Visualization*) eingesetzt. Mit Hilfe des aufgenommenen EKG-Signals werden mehrere aufeinander folgende Herzkontraktionen „übereinandergelagert“, so dass wesentlich rauschärmere Aufnahmen möglich sind.

2.2.1.6.2 Berechnung der linksventrikulären Masse

Die linksventrikuläre Masse wurde anhand von EKV-Aufnahmen in der Diastole bestimmt. Gemessen wurde die Längsachse (LV Major, mm) sowie der endo- und epikardiale Flächeninhalt (LV Area, mm²) des linken Ventrikels.

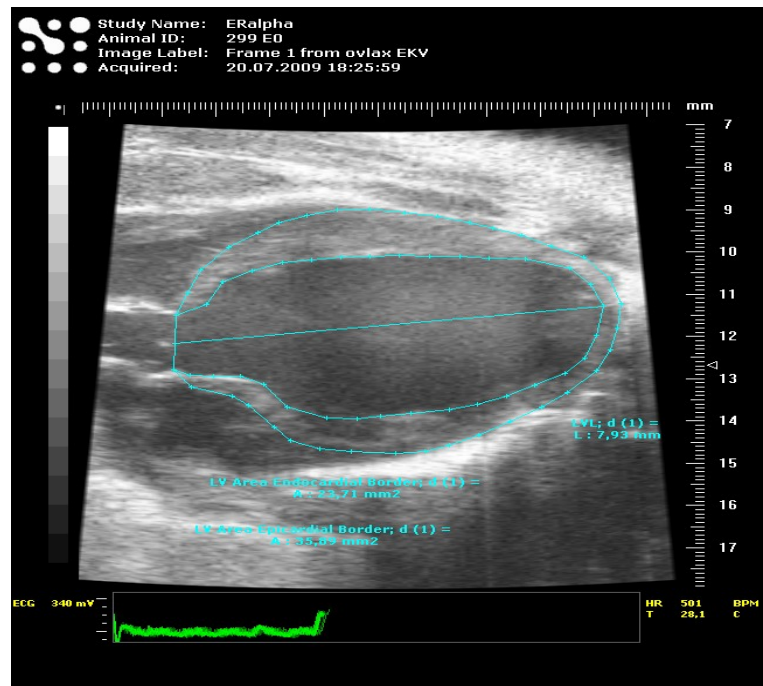


Abbildung 7: Vevo Ultrasound Imaging System, EKV-Mode, Exemplarische Darstellung der parasternalen langen Achse des linken Ventrikels in der Diastole

Zur Berechnung der linksventrikulären Masse (LVM, mg) diene folgende Formel:

$$LVM = 1,05 \times \left[\left(\frac{5}{6} \times \text{Epikardiale Fläche} (d) \times (\text{Epikardiale Achse} (d) + T) \right) - \left(\frac{5}{6} \times \text{Endokardiale Fläche} (d) \times \text{Endokardiale Achse} (d) \right) \right]$$

Wobei die durchschnittliche linksventrikuläre Wanddicke T wie folgt berechnet wurde:

$$T = \sqrt{\frac{\text{Epikardiale Fläche} (d)}{\pi}} - \sqrt{\frac{\text{Endokardiale Fläche} (d)}{\pi}}$$

2.2.1.6.3 Berechnung der Ejektionsfraktion

Die Ejektionsfraktion wurde anhand von EKV-Aufnahmen in Systole und Diastole bestimmt. Gemessen wurde jeweils die Längsachse (LV Major, mm) sowie der endokardiale Flächeninhalt (LV Area, mm²) des linken Ventrikels (LV).

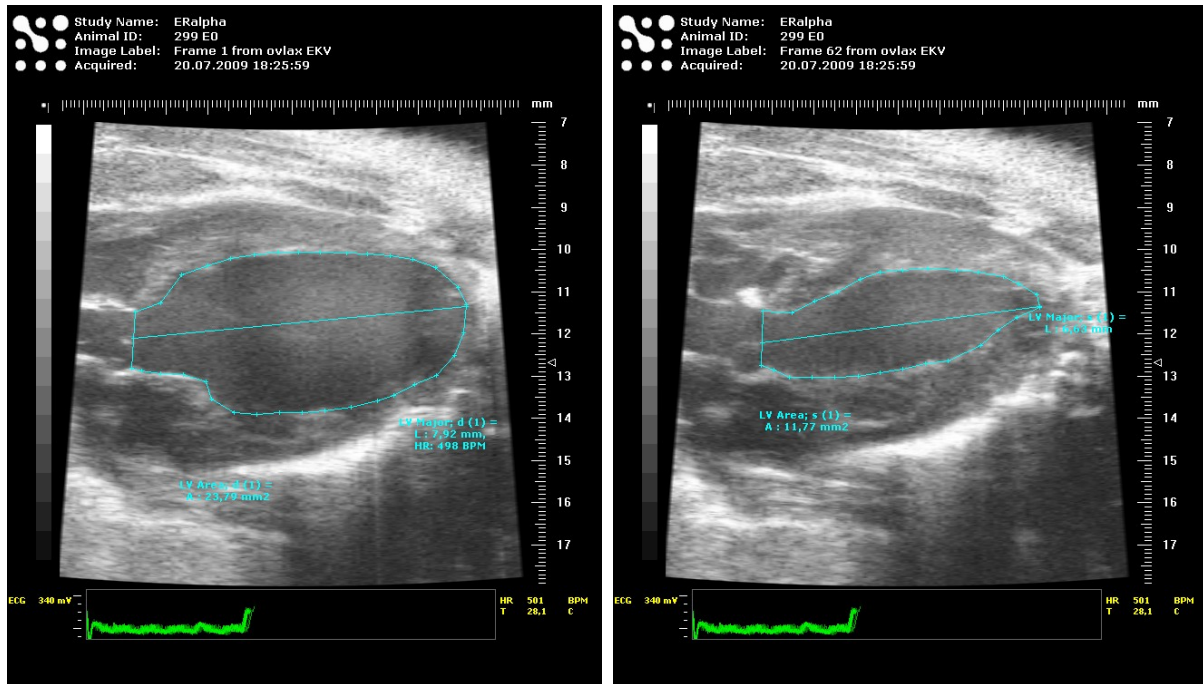


Abbildung 8: Vevo Ultrasound Imaging System, EKV-Mode, Exemplarische Darstellung der parasternalen langen Achse des linken Ventrikels in der Diastole (links) und in der Systole (rechts)

Anhand der parasternalen linksventrikulären Achse sowie dem endokardialen Flächeninhalt in der Systole und Diastole ließen sich die linksventrikulären Volumina in der Systole ($LV Vol_s$) bzw. in der Diastole ($LV Vol_d$) und wiederum daraus die Ejektionsfraktion (EF) nach folgenden Formeln berechnen:

$$LV Vol_s (\mu l) = \frac{4\pi}{3} \times \frac{LV Achse (s)}{2} \times \left(\frac{LV Fläche (s)}{\pi \left(\frac{LV Achse (s)}{2} \right)} \right)^2$$

$$LV Vol_d (\mu l) = \frac{4\pi}{3} \times \frac{LV Achse (d)}{2} \times \left(\frac{LV Fläche (d)}{\pi \left(\frac{LV Achse (d)}{2} \right)} \right)^2$$

$$EF (\%) = \frac{LVvol,d - LVvol,s}{LVvol,d} \times 100$$

2.2.1.6.4 Berechnung der Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde anhand von EKV-Aufnahmen in der Diastole bestimmt. Entsprechend vergleichbarer Ansätze in der Literatur (Ikeuchi et al., 2005) wurde der Umfang des

Infarktbereichs (LV Infarkt, mm) bestimmt und mit dem gesamten linksventrikulären Umfang (LV, mm) in Relation gebracht.

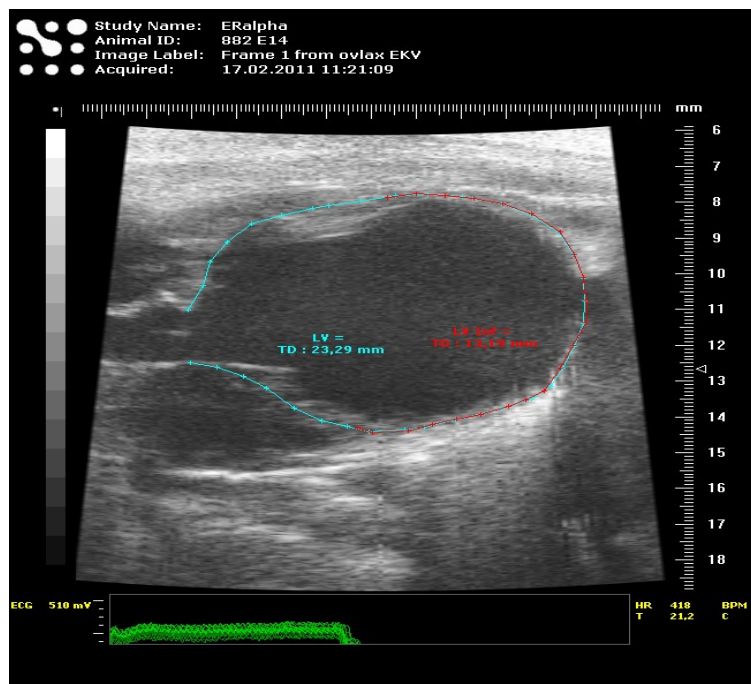


Abbildung 9: Vevo Ultrasound Imaging System, EKV-Mode, Exemplarische Darstellung der parasternalen langen Achse des linken Ventrikels eines infarzierten Tieres in der Diastole

Zur Berechnung diente folgende Formel:

$$\text{Infarktgröße (\%)} = \frac{LV \text{ Inf}}{LV} \times 100$$

2.2.1.7 Organentnahme

Die Organentnahme fand immer am 15.Tag nach der Operation statt. Nachdem die Tiere gewogen worden waren, wurden sie mit einer Überdosis Isofluran narkotisiert. Hierfür wurden sie mit einer Hand im Nackenfell und am Schwanz fixiert und mit der Schnauze in ein mit einem Isofluran-getränktem Wattebausch befülltes Röhrchen geführt. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Diese Methode ging sehr schnell (max. 10 Sekunden) und die Tiere führten praktisch keinerlei Abwehrbewegungen aus.

Sofort im Anschluss wurde der Brustkorb mit einer Schere eröffnet und das Herz samt Lunge herauspräpariert. Die Lunge wurde, nachdem sie in einer eisgekühlten Pufferlösung (PBS) gewaschen und von Trachea befreit war, gewogen und in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Das Herz wurde von den Aurikeln getrennt, ebenfalls gewaschen und gewogen. Anschließend wurde die Herzspitze (Teil des linken Ventrikels) abgeschnitten. Ein folgendes ungefähr 1mm dickes Mittelstück des Herzens (rechter und linker Ventrikel) wurde für histologische Untersuchungen entweder in 4%igem Formalin fixiert oder in flüssigem

Stickstoff schockgefroren. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde eine quaderförmige Stanzprobe ($\sim 1\text{mm}^3$) aus dem Infarkttrandgebiet bzw. aus dem gesunden linken Ventrikel entnommen und in mit 2,5% Glutaraldehyd versetztem 0,1M Kakodylat-Puffer (pH 7.3) fixiert. Das nun verbleibende Herz wurde in rechten Ventrikel, Septum und linken Ventrikel getrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Bestimmung des Verhältnisses von Herzgewicht/Tibiallänge bzw. LV-Gewicht/Tibiallänge wurde eine Tibia herauspräpariert und deren Länge mit Hilfe eines Messschiebers bestimmt.

2.2.1.8 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten und Zellkultur

Zur Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten aus 2-3 Monate alten weiblichen und männlichen WT- and ER α OE-Mäusen wurden die Tiere zunächst mit Isofluran und anschließend durch intraperitoneale Injektion von 8 μg Xylazin and 35 μg Ketamin betäubt. Die Herzen wurden rasch entnommen und in einem Langendorff-Perfusionssystem mit einem Ca^{2+} -freiem Kollagenase-Bicarbonatpuffer (36°C, pH 7.4) für 10 Minuten perfundiert. Im Folgenden wurden die Ventrikel schonend zerkleinert und erneut für 10 Minuten in obigem Puffer verdaut. Nach mehreren Waschschritten und Filtration durch ein Nylonsieb wurden die isolierten Kardiomyozyten in M199 medium (Sigma, Deutschland) aufgenommen und mit 0.2% BSA, 5% FCS, 5 mmol/l Kreatin, 5 mmol/l Taurin, 2 mmol/l Carnitin, 10 $\mu\text{mol/l}$ Cytosin-D-arabinofuranosid und Antibiotika versetzt. Diese Kardiomyozytensuspension wurde in mit 0.2% Laminin-behandelten 4-Loch-Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden-Schierstein, Deutschland) für 4 Stunden kultiviert. Abschließend wurde die Messung von Kardiomyozytenlänge und -breite vorgenommen. Alle Schritte dieser Arbeiten erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ingo Morano am Max-Delbrück-Zentrum (Berlin).

2.2.2 Messung der mitochondrialen Respiration

Zur Messung der Mitochondrienatmung gibt es unterschiedliche Versuchsansätze. Einerseits kann das Gewebe homogenisiert werden und reine Mitochondriensuspensionen untersucht werden. Andererseits kann das Gewebe mechanisch in einzelne Muskelfasern geteilt werden. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Vorteilhaft an reinen Mitochondriensuspensionen ist, dass bei Zugabe einer Substratlösung jeweils die maximale respiratorische Kapazität gemessen werden kann, da die Substrate schnell durch die Mitochondrienmembran aufgenommen werden können. Andererseits werden aber die normalen Interaktionen der Mitochondrien untereinander und mit anderen Organellen aufgehoben. Zudem kann es bei der Isolation aus geschädigtem Gewebe zur Selektion von intakten Mitochondrien kommen, wodurch das Versuchsergebnis stark verfälscht würde. Durch die schonende mechanische Zerkleinerung in einzelne Muskelfasern können diese

zwei wesentlichen Nachteile umgangen werden. Daher wurde zur Messung der Mitochondrienatmung der zweite Versuchsansatz gewählt, wobei unter geringen Modifikationen das Protokoll von Kuznetsov und Mitarbeitern (Kuznetsov et al., 2008) angewendet wurde.

Nachdem scheinoperierte bzw. infarzierte Mäuse durch zervikale Dislokation getötet worden waren, wurde das Herz entnommen und der linke Ventrikel in CO₂-begastem Krebs-Puffer auf Eis freipräpariert. Bei infarzierten Tieren wurde der Infarktbereich abgetrennt und verworfen. In S-Lösung wurde nun eventuell vorhandenes Fett- und Bindegewebe sowie das Endokard vom linken Ventrikel getrennt. Nachdem bei infarzierten Tieren der Perinfarktbereich vom Remote-Bereich getrennt worden war, erfolgte die mechanische Zerkleinerung des Gewebes in einzelne Muskelfasern. Isolierte Muskelfasern wurden in 3ml mit Saponin versetzter S-Lösung bei 4°C für 30 Minuten vorsichtig geschüttelt und anschließend zweimal mit 3ml R₀-Lösung (versetzt mit 2mg/ml BSA, 2mM Malat und 5mM Glutamat) für 10 Minuten gewaschen. Danach wurde die Messung der mitochondrialen Atmung bei 25°C vorgenommen. Diese erfolgte im Oxygraphen, einer abgeschlossenen Elektrodenkammer, bei der die Sauerstoffkonzentration einer Substratlösung in der Kammer mit Hilfe einer sog. Clark-Elektrode gemessen werden kann. Ein Rührfisch in der Elektrodenkammer sorgte hierbei für die ständige Durchmischung der zu messenden Lösung (Abb. 10).

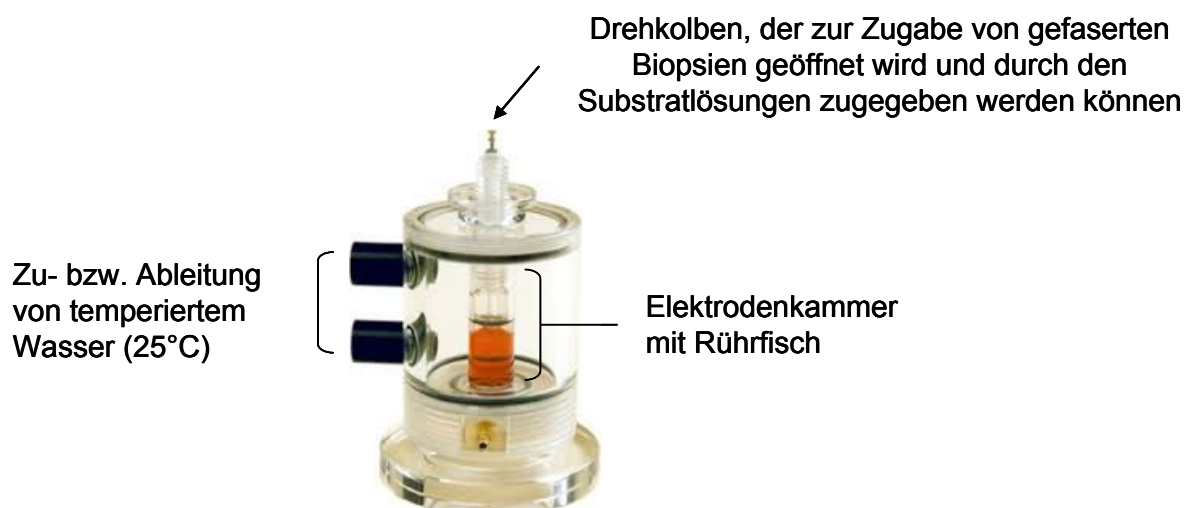


Abbildung 10: Elektrodenkammer zur Messung des Sauerstoffverbrauchs gefasierter Muskelbiopsien

Vor jeder Messung wurden die Kammern mit 1 ml KCl-Lösung (versetzt mit 2mg/ml BSA, 2mM Malat und 5mM Glutamat) befüllt und das System für 10 Minuten äquilibriert. Wenn die in der Kammer gemessene Sauerstoffkonzentration konstant blieb, wurden die isolierten Muskelfasern in die Kammer transferiert und für ca. 1 Minute der Sauerstoffverbrauch im Grundzustand gemessen. Die maximale mitochondriale Atmung wurde nun durch Zugabe von 5µl einer 0,5M ADP-Lösung (entspricht einer 2,5mM ADP-Konzentration in der

Elektrodenkammer) für 2 Minuten gemessen. Dieser Zustand des Substratüberschusses in der Lösung wird als *State 3* bezeichnet. Nun wurden 10µl einer 0,5mM Rotenon-Lösung zugesetzt, wodurch der Komplex 1 (NADH-Oxidoreduktase) der Atmungskette inhibiert wird. Da die Substrate Malat und Glutamat nun nicht mehr umgesetzt werden können, sinkt der Sauerstoffverbrauch. Dies wurde wiederum für 2 Minuten gemessen. Anschließend wurden 10µl einer 1M Succinat-Lösung zugegeben (10mM Succinat in der Elektrodenkammer). Succinat ist Substrat für Komplex 2 (Succinat-Dehydrogenase) der Atmungskette. Dadurch stieg der Sauerstoffverbrauch in der Elektrodenkammer wieder an und wurde für 2 Minuten gemessen. Zur Kontrolle der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran wurden nun 10µl einer 1,6mM Cytochrom C-Lösung zugegeben und der Sauerstoffverbrauch für 2 Minuten gemessen. Sollte die äußere Mitochondrienmembran bei der Isolation oder bedingt durch die Infarktsetzung geschädigt worden sein, wäre das normalerweise an zytosolischen Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Cytochrom C von dieser abgelöst worden und somit der Elektronentransport von Komplex 3 zu Komplex 4 der Atmungskette unterbrochen worden. Durch künstliche Zugabe von Cytochrom C würde die Atmungskette teilweise wieder geschlossen werden und somit die Atmungsaktivität ansteigen. Dies war jedoch nie der Fall. Abschließend wurde die Versuchslösung mit 7,5µl einer 1M Natriumazid-Lösung versetzt. Azid bindet an das aktive Zentrum der Cytochrome, wodurch die mitochondriale Atmung fast vollständig zum Erliegen kommt. Diese sogenannte *State 4-Respiration* wurde für 8 Minuten aufgezeichnet. Um die Atmungsaktivität in Relation zum Trockengewicht des eingesetzten Gewebes berechnen zu können, wurden die jeweiligen Gewebeproben über Nacht bei 37°C getrocknet und danach gewogen. Die Auswertung des je nach Substratzufuhr unterschiedlichen Sauerstoffverbrauchs in der Elektrodenkammer erfolgte mit Hilfe der Oxygraph Plus Software.

2.2.3 Histologische Untersuchungen

2.2.3.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Der mittlere Ring des linken Ventrikels wurde für 24h in neutral gepufferter, wässriger Formalinlösung mit 4% Formaldehyd bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben in Einbettkassetten eingeschlossen und sie durchliefen ein automatisiertes sog. Paraffinkarussell. Die ersten Stufen dieses Einbettautomaten dienten der Entfernung des Fixiermittels und der Dehydratation des Gewebes. Hierzu durchlief es eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70%-, 80%, 96%- und dreimalig 100%-igem Ethanol für jeweils 1h bei RT. Um den Alkohol zu entfernen folgte eine einstündige Inkubation im Intermediärmedium Neoclear. Abschließend wurde das Gewebe für jeweils 1,5h in Paraffin Typ 6 und Paraffin Typ 9 bei 58°C getränkt. Paraffin 9 enthält mehr Polymere als Typ 6 und eignet sich für sehr dünne Schnitte. Um die Gewebe in einspannbare und schnittfähige Blocks einzubetten,

bediente man sich metallener Ausgussformen. Die Ventrikel wurden aus der Einbettkassette genommen und jeweils in eine Ausgussform gelegt und 58°C heißes Paraffin Typ 9 in die Form gegossen. Die Einbettkassette mit Beschriftung bildete den Blockträger. Der Paraffinblock wurde anschließend auf einer Kälteplattform bei 0°C für ca. 1h ausgehärtet und nachdem er aus der Form geschlagen wurde bei RT aufbewahrt.

Zum Anfertigen der Paraffinschnitte wurden die Paraffinblöcke zwei Stunden vor Beginn bei -20°C zwischengelagert, um auszuhärten. Nach dem Einspannen der Paraffinblöcke in die dafür vorgesehene Halterung am Mikrotom wurde zunächst die über dem Gewebe liegende Paraffinschicht abgeschnitten. Nachdem das Gewebe freigelegt worden war, betrug die Schnittdicke je nach weiterer Bearbeitung 2-5µm. Die einzelnen Schnitte wurden zuerst in einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und danach in einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt, um möglichst glatt auf den Objektträger aufgelegt zu werden. Pro Objektträger wurden 2-3 Schnitte angefertigt. Die fertigen Schnitte wurden in Objektträgerkassetten bei RT aufbewahrt.

2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Färbung von Gewebeschnitten mit Hämatoxylin-Eosin diente in erster Linie dazu, eine Übersicht über den Querschnitt des linken Ventrikels in infarzierten und scheinoperierten Mäusen zu gewinnen. Durch diese Färbung werden Kerne braun bis blau sowie das Zytoplasma rosa bis rot gefärbt. Anhand der HE-Färbung kann so z.B. das Infarktareal im linken Ventrikel durch das weitgehende Fehlen von kernhaltigen Zellen von den nicht infarzierten Bereichen unterschieden werden.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte zur Paraffinentfernung für 10 Minuten in Neoclear gebadet. Um die Schnitte zu rehydratisieren, folgte eine absteigende Alkoholreihe mit 100%-, 96%-, 80%- und 70%-igem Ethanol sowie destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten. Die Objektträger wurden aus dem Wasser genommen, die Flüssigkeit abgeklopft und für 5-10 Minuten in Hämatoxylin-Lösung inkubiert, wodurch die Zellkerne braun gefärbt wurden. Durch anschließendes Spülen der Schnitte in fließendem Leitungswasser für 5-7 Minuten erfolgte das sog. Bläuen der Zellkerne. Im anschließenden Schritt, der Eosin-Färbung für 2 Minuten, wurde das Zytoplasma rötlich gefärbt. Abschließend werden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gespült, in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, und zweimal 100% Ethanol für jeweils 30 Sekunden sowie zweimal Neoclear für 5 Minuten) dehydratisiert, mit Einbettmedium überschichtet und schließlich eingedeckelt. Übersichtsaufnahmen am Lichtmikroskop wurden mit einer Digitalkamera festgehalten.

2.2.3.3 Immunhistologie

Zunächst wurden die Paraffinschnitte zur Paraffinentfernung zweimal für 10min in Neoclear gebadet. Um die Schnitte zu rehydratisieren, folgte eine absteigende Alkoholreihe mit 2x 100%-, 96%-, 80%- und 70%igem Ethanol für jeweils 5min sowie destilliertem Wasser für 5min. Zum Demaskieren wurden die Schnitte in vorgewärmtem Zitronensäurepuffer überführt und in der Mikrowelle für dreimal 5min bei 600 Watt gekocht, wobei darauf geachtet wurde dass die Schnitte infolge des verdampfenden Puffers nicht austrockneten. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 20min im Zitronensäurepuffer auf Raumtemperatur abgekühlt und kurz in PBS-T abgespült.

In Abhängigkeit von der Größe wurden die Schnitte mit 100-200µl Blocking-Puffer (3% BSA in PBS-T) versetzt und für 1h bei RT inkubiert. Daraufhin wurden ca. 100µl des Primär-AK (ER α [MC-20] 1:50 verdünnt in 0,1% BSA-PBS-T) zur Inkubation über Nacht bei 4°C eingesetzt. Die als erste Negativkontrolle eingesetzten Schnitte wurden nicht mit dem Primär-AK behandelt. Nachdem die Schnitte anschließend dreimal für 10min in PBS-T gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-AK (FITC-konjugierter *goat anti-rabbit* 1:50 verdünnt in 0,1% BSA-PBS-T + 3% *goat serum*) für 1h bei RT unter lichtgeschützten Bedingungen. Die als zweite Negativkontrolle eingesetzten Schnitte wurden weder mit Primär- noch Sekundär-AK behandelt. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte, nachdem der Sekundär-AK vom Objektträger abgekippt wurde, für 3min mit DAPI-Lösung (6-Diamidino-2-Phenyl-Indol 1:50.000 verdünnt in 0,1% BSA-PBS-T) benetzt und anschließend 10min gewaschen.

Zur Verringerung der Autofluoreszenz wurde abschließend noch eine Sudan-Black-Färbung (0,1% [w/v] Sudan-Schwarz in 70% Ethanol, filtriert) für 20min bei RT vorgenommen. Danach wurden die Schnitte vorsichtig getrocknet und mit Mounting Medium (Vectashield, H-1000) eingedeckelt. Bis zur Untersuchung am Konfokal-Lasermikroskop wurden die fertigen Schnitte bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Alle elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian Bachmann unter Anleitung von Frau Petra Schrade (Campus Virchow-Klinikum, Charité Berlin) durchgeführt. Die in 2,5% Glutaraldehyd fixierten linksventrikulären Biopsien wurden zur Nachfixierung in mit 2% Osmiumtetroxid versetztem 0,1M Kakodylatpuffer für 2h gebadet, in aufsteigender Ethanolreihe dehydratisiert und in Eponharz (SERVA) eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden nach Reynolds (Reynolds, 1963) mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 906, Zeiss) angefertigt.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Genotypisierung

Zur Überprüfung des Genotyps der Versuchsmäuse dienten Schwanzbiopsien (ca. 2mm der Schwanzspitze), die im Alter von 5 Wochen entnommen wurden. Diese wurden während des Transports bei -20°C gekühlt.

2.2.5.1.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

Die bei -20°C gelagerten Schwanzbiopsien wurden ggf. auf eine Länge von ungefähr 1mm gekürzt. In einem 1,5ml-Probengefäß wurden sie mit jeweils 75µl einer alkalischen Lösung (25mM NaOH, 0,2mM EDTA) versetzt und für 20 Minuten bei 95°C unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gelagert und dann für 10 Sekunden bei 2000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde jede Probe mit 75µl einer neutralisierenden Lösung (40mM Tris-HCl) versetzt und vermischt. Die Proben wurden anschließend bis zur PCR auf -20°C gelagert.

2.2.5.1.2 PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Die isolierte genomische DNA wurde eingesetzt, um mittels PCR zu untersuchen, ob bzw. welches der Transgene (ER α oder tTA) im betreffenden Tier exprimiert wurden. Auf eine Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA wurde verzichtet, da keine quantitative sondern nur eine qualitative Bestimmung durchgeführt werden sollte (d.h. es wurden im Normalfall 1µl der DNA-Lösung aus der DNA-Isolierung eingesetzt; sollte es hierbei zu einem unklaren Ergebnis kommen, wurden zur Wiederholung 3µl eingesetzt). Um zu kontrollieren, dass die genomische DNA intakt ist, wurde jeweils zusätzlich die Expression des *housekeeping genes* α Aktin als Kontrolle überprüft.

Die PCR wurde mit Hilfe eines Kits der Firma PeQLab durchgeführt. Die zu amplifizierende DNA (1-3µl) wurde mit jeweils 2,5µl 10x Probenpuffer, 1,6µl dNTPs, 1,25µl Primermix (jeweils 5µM FW und Rev Primer) und 0,125µl Taq-Polymerase (5u/µl) versetzt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 25µl aufgefüllt:

Tabelle 2: Zur Genotypisierung verwendete Primerpaare

Transgen	Primersequenz (5'→3')
ER α FW	CGAGCTCGGTACCCGGGTCG
ER α Rev	GAACACAGTGGGCTTGCTTGTTG
tTA FW	AACAACCCGTAAACTCGCCAGAAAG
tTA Rev	CGCAACCTAAAGTAAAATGCCCCAC
α Aktin FW	GTGTTAGACACTGTGGACATGG
α Aktin Rev	GAGAGAGCCATACCAAGAATGG

Die PCR wurde im Gradientencycler (Mastercycler Gradient) in folgenden Schritten durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
	95°C	5 Minuten	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	} 38
Annealing	57°C	45 Sekunden	
Elongation	72°C	50 Sekunden	
	72°C	7 Minuten	1
	15°C	1 Minute	1

Nach der PCR wurde die Reaktionslösung mit 2,8 μ l 10x DNA-Probenpuffer vermischt. Davon wurden 10 μ l auf ein 1,5%iges Agarosegel (1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer) aufgetragen. Nachdem das Gel für 40 Minuten bei 120V gelaufen war, wurden die einzelnen Proben (per UV-Visualisierung der GelRed[®]-gefärbten DNA) auf amplifizierte Produkte überprüft. Die Größe möglicher Amplifikate war: ER α 372 bp, tTA 350 bp und α Aktin 450 bp.

2.2.5.2 Isolierung von RNA

Vor der Homogenisierung wurden die tiefgekühlten Gewebeproben auf Trockeneis mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert. Jeweils 20-50 mg Gewebe wurden in Lysing Matrix D-Röhrchen überführt und mit 1 ml RNAzol B versetzt. Dann erfolgte die mechanische Homogenisierung des Gewebes für 2 x 20 Sekunden. Die homogenisierte Probe wurde für 5 Minuten auf Eis gelagert. Zum weiteren Aufschluss des Gewebes wurde die Probe für 30 Minuten bei 4°C heftig geschüttelt. Anschließend wurde die Probe in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 200 μ l Chloroform dazu pipettiert und für 2 Minuten geschüttelt. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C für 10 Minuten, wodurch sich drei Phasen (unten phenolische Phase mit Proteinen und nicht aufgeschlossenen Zellbestandteilen, Interphase mit genomischer DNA, oben wässrige Phase mit RNA) ausbildeten. Unter Vermeidung der eventuell gebildeten Fettschicht wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an eisgekühltem Isopropanol versetzt. Die nun folgende Präzipitation der RNA wurde bei -

20°C über Nacht vorgenommen. Am nächsten Tag wurde die RNA mittels Zentrifugation (14000 rpm bei 4°C) für 30 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit von 750µl gekühltem 80% Ethanol gewaschen und jeweils für 5 Minuten bei 8000 rpm (4°C) zentrifugiert. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet worden war wurde es je nach Probengewicht in 20-50 µl DEPC-Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 Isolierung von DNA

Tiefgekühlte Gewebeproben (ca. 10mg) wurden mit 350µl Lysispuffer und 20µl Proteinase K (10mg/ml) versetzt und für 12h im Heizblock bei 55°C unter Schütteln (400rpm) verdaut. Sollte das Gewebe anschließend nicht vollständig verdaut worden sein, wurden erneut 20µl Proteinase K zugegeben und die Probe für eine weitere Stunde bei 55°C inkubiert. Danach wurde die Suspension für 5 Minuten auf Eis gekühlt, anschließend mit 150µl 5M NaCl versetzt, gemischt und nochmals für 5 Minuten auf Eis gelagert. Um Gewebereste zu pelletieren, wurde die Probe bei 12000 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 2µl RNase A (10u/µl) und Inkubation bei 37°C für 15 Minuten wurde die RNA verdaut. Anschließend wurde die Probe zur DNA-Fällung mit 500µl eisgekühltem Isopropanol versetzt, gut gemischt und bei 12000 rpm bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit 500µl gekühltem 70% Ethanol gewaschen und jeweils für 15 Minuten bei 12000 rpm (4°C) zentrifugiert. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet worden war, wurde es je nach Pelletgröße in 50-100µl destilliertem Wasser resuspendiert.

2.2.5.4 Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit und Menge der isolierten Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch bestimmt. 1µl der Nukleinsäure-Lösung wurde bei einer Wellenlänge λ von 260 nm und 280 nm gemessen. Das Absorptionsverhältnis von $\lambda_{260\text{nm}}/\lambda_{280\text{nm}}$ gab Auskunft über die Reinheit der gewonnenen Nukleinsäuren. Der gemessene Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei der Bestimmung der Konzentration wird davon ausgegangen, dass eine OD von 1 bei 260 nm 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml DNA entspricht.

2.2.5.5 Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription aus mRNA

Zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA) wurden 500ng isolierter Gesamt-RNA verwendet. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*. Ein Reaktionsansatz (20µl) beinhaltete 2µl 10x RT Puffer, 0,8µl dNTP-Mix (100mM), 2µl 10x Random Primer, 1µl Reverse Transkriptase (50u/µl), 0,25µl RNase Inhibitor (40u/µl), 4µl RNA-Lösung (125ng/µl) und 9,95µl DEPC-Wasser.

Die Transkription der RNA in 0,2ml-Reaktionsgefäßen erfolgte in drei Schritten: Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 25°C, Transkription für 120 Minuten bei 37°C und Inaktivierung der Transkriptase für 5 Minuten bei 85°C. Die Proben wurden anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.5.6 *Real time (Echtzeit)-PCR*

Zur Amplifikation bestimmter cDNA-Abschnitte mittels spezifischer Primer durch die RT-PCR wurde zur Detektion SYBR[®]-Green als fluoreszierender Reporterfarbstoff eingesetzt. SYBR[®]-Green verhält sich als interkalierender Farbstoff, der sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA einlagert. Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Der Vorteil von SYBR[®]-Green ist die universelle Verwendbarkeit, da es unspezifisch eingebaut wird und in jeder beliebigen PCR-Reaktion eingesetzt werden kann, sowie die hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle bindet. Darüber hinaus ist die Verwendung von SYBR[®]-Green im Vergleich zum Einsatz von spezifischen Sonden die kostengünstigere Variante. Es fehlt jedoch eine spezifische Bindung des Fluorophors an die zu amplifizierende Ziel-DNA, sodass eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren, die während der PCR-Reaktion auch einen Fluoreszenzanstieg verursachen können, nicht möglich ist. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren ist im Anschluss an den PCR-Lauf mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Dabei kommt es durch schrittweise Temperaturerhöhung zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterscheiden, da Primerdimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte. Die PCR wurde im Gradientencycler (Mastercycler Gradient) in folgenden Schritten durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
	95°C	5 Minuten	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	} 38
Annealing	57°C	45 Sekunden	
Elongation	72°C	50 Sekunden	
	72°C	7 Minuten	1
	15°C	1 Minute	1

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Messung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten *Threshold Cycle* oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz einen festgelegten Fluoreszenz-

Schwellenwert übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen *Template*-Konzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte gibt. Parallel dazu wird in jedem PCR-Lauf eine Standardkurve amplifiziert, wobei aus einer Mischung aller untersuchten Proben definierte Mengen an cDNA eingesetzt werden. Aus der später gemessenen Eichgerade ergeben sich die für die einzelnen Proben relevanten Expressionswerte des Zielgens. Um die relativen Expressionswerte zu ermitteln wurde dieselbe RT-PCR auch für ein Haushaltsgen (*house keeping gene*) durchgeführt. Aus dem Verhältnis von Zielgen zu Haushaltsgen wurden die Expressionswerte ermittelt. Die mit Hilfe der TAQ-Man Software ermittelten Expressionswerte ließen sich anschließend mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 5.0 graphisch darstellen und statistisch auswerten.

2.2.5.7 Proteinextraktion aus Myokardgewebe

Zunächst wurde das Gewicht der bei -80°C aufbewahrten Gewebeproben bestimmt. Die gefrorenen Proben wurden im 7fachen ihres Gewichts an eisgekühltem Lysispuffer (10mM Tris [pH 7.5], 140mM NaCl, 1mM EDTA, 25% Glycerol, 0.5% Nonidet P-40, 5mM DTT, 1mM PMSF, Complete [Proteinaseinhibitor], 1mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , 1x Phosphostop [Phosphataseinhibitor]) in einem Reaktionsgefäß, welches zur Hälfte mit Porzellankügelchen gefüllt ist (Lysis Matrix D), aufgenommen und homogenisiert. Nach der Homogenisation wurden pro 100 μl Puffer 5 μl 10% SDS zugegeben, die Probe kurz gemischt und für 20 Minuten auf Eis lysiert. Nach anschließendem Mischen wurde die Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 14000 rpm zentrifugiert. Eine hiernach möglicherweise bestehende Fettschicht wurde abgenommen und der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein kleiner Teil der Lösung wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen, der restliche Teil bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 20 μl einer 1:40 Verdünnung der oben isolierten Proteinlösung mit 300 μl Farbstoffgemisch (Pierce BCA Protein Assay Reagents [Reagents A und B im Verhältnis 50:1]) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die

Messung der Proteinkonzentration erfolgte auf einer 96-Loch-Platte mit Flachboden im ELISA Platten Reader bei $\lambda=550$ nm. Als Referenz wurde eine Albuminstandardreihe benutzt.

2.2.5.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können entsprechend ihres Molekulargewichts über SDS-PAGE aufgetrennt werden. Hierfür wurden 20,5 x 8,5 cm große Trenngele (8-12% Polyacrylamid) verwendet. Nach der vollständigen Polymerisierung wurde das Trenngel mit einem sog. Sammelgel (5% Polyacrylamid) überschichtet. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Neben den Proteinproben wurde ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100-120V im Kühlraum bei 4°C bis die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine entweder im Gel mittels Coomassie-Färbung angefärbt oder durch Blotting auf eine Membran transferiert und weiter analysiert.

2.2.5.10 Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Um zu überprüfen, ob die Proteine beim Blotting auf die Membran vollständig transferiert wurden bzw. ob gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden, wurde das Gel für 1h in Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel so lange in Entfärbelösung gebadet bis die Intensität eventuell im Gel verbliebener Proteinbanden deutlich stärker war als der Hintergrund.

2.2.5.11 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Somit konnten bestimmte Proteine mittels spezifisch bindender AK detektiert werden. Hierfür wurden das Polyacrylamidgel sowie die Membran für 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Danach wurden das Gel und die Membran „sandwichartig“ zwischen Whatman-Papier und Schwämmen eingebettet und in eine mit 5l 1xTransferpuffer befüllte Elektro-Blot-Kammer eingeführt. Das Blotting erfolgte entweder bei 18V für 14h oder bei 100V für 1,5h bei 4°C. Um den erfolgreichen Proteintransfer auf die Membran zu überprüfen, wurde die Membran für 1 Minute mit Ponceau Rot gefärbt und anschließend kurz mit Aqua bidest. gewaschen. Bis zur AK-Hybridisierung wurden die Membranen bei 4°C gelagert.

2.2.5.12 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zur quantitativen Proteinanalyse wurden die auf Nitrozellulosemembranen transferierten Proteine mit spezifischen AK hybridisiert. Die Inkubationszeiten und Konzentrationen der eingesetzten AK variierten je nachdem, welches Protein detektiert werden sollte.

Im Allgemeinen wurde die Membran zunächst in *Blocking*-Puffer (1-5% BSA [w/v] oder 1-5% Magermilchpulver [w/v] in TBS-T) gebadet, um unspezifische Bindungen des AK zu minimieren. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen, gegen das Zielprotein gerichteten Primär-AK (Konzentrationen und Inkubationszeiten siehe Tabelle 3). Ungebundener Primär-AK wurde durch dreimaliges Waschen in TBS-T für jeweils 10 Minuten entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundär-AK inkubiert (Konzentrationen und Inkubationszeiten siehe Tabelle 3) und wiederum nicht gebundener AK durch dreimaliges Waschen in TBS-T entfernt. Der Sekundär-AK, der gegen den konstanten Abschnitt des Primär-AK gerichtet ist, ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert. Bei der abschließenden Detektion des Zielproteins mittels Inkubation der Membran mit ECL-Lösung im Dunkeln sorgt dieses Enzym für die Chemilumineszenz-Reaktion, die mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert wurde. Der entwickelte Röntgenfilm wurde mit Hilfe eines Durchlichtscanners gescannt und die Proteinbanden anschließend mit dem Computerprogramm ImageJ ausgewertet.

Tabelle 3: Übersicht der bei Western-Blot-Analysen verwendeten AK. Dargestellt sind die Kombinationen aus Primär-AK und Sekundär-AK unter Angabe des verwendeten Puffers, der Konzentration sowie der Inkubationszeit.

Primär-AK			Sekundär-AK		
Name	Verdünnung	Zeit	Name	Verdünnung	Zeit
ER α (G-20)	1:300 ¹	4h	Anti-Kaninchen	1:10000 ¹	1h
pER α (serin 118)-R	1:200 ²	12h	Anti-Kaninchen	1:5000 ²	1h
GAPDH	1:50000 ¹	12h	Anti-Maus	1:15000 ¹	1h
Tubulin	1:10000 ¹	12h	Anti-Maus	1:15000 ¹	1h

1 5% [w/v] Magermilch in 0,1% TBS-T

2 5% [w/v] BSA in 0,1% TBS-T

Das Abwaschen der AK („stripfen“) erfolgte für 30 Minuten unter Verwendung eines Glycin-Stripping-Puffers bei 50°C unter leichtem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS-T für jeweils 10 Minuten konnte die Membran zum erneuten Proteinnachweis verwendet werden.

2.2.6 Statistik

Alle statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0 ausgeführt. Die quantitativen Daten wurden als Mittelwert \pm SEM

(*standard error of the mean*) dargestellt. Statistische Unterschiede mit Hilfe eines One-Way-ANOVA bei normalverteilten Daten bzw. mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test bei nicht normalverteilten Daten berechnet. Als Post-Hoc-Tests diente der Bonferroni- bzw. Dunns-Test. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf 5% ($p < 0,05$) festgelegt.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion des ER α im Herzen nach einem Myokardinfarkt (MI) zu untersuchen. Bisher veröffentlichte Studien zu diesem Thema nutzten Versuchsansätze, die die Funktion des ER α im gesamten Organismus veränderten. Anhand des in diesem Kontext noch nicht verwendeten ER α OE-Mausmodells wird analysiert, ob sich eine auf die Kardiomyozyten beschränkte ER α -Überexpression nach MI vorteilhaft auswirken kann. Als Zeitpunkt der Untersuchungen wurde der Tag 14 nach Infarktinduktion bzw. Scheinoperation (*sham*-Operation) gewählt. Zu diesem Zeitpunkt sind bei Mäusen im infarzierten Herzen nur noch wenige nekrotische bzw. apoptotische Zellen anzutreffen und die inflammatorische Phase, d.h. die Infiltration des Myokards durch Zellen des Immunsystems, ist abgeschlossen. Ebenso ist der Gewebeumbau mit der potentiellen Gefahr von tödlichen Arrhythmien oder Herzrupturen weitestgehend vollendet. Im Infarktbereich hat sich eine stabile Infarktnarbe ausgebildet und im vom Infarkt verschonten Myokard ist es zu einer der gesteigerten Druck- und Volumenlast entgegenwirkenden kompensatorischen Hypertrophie gekommen. Am Tag 14 nach Infarktinduktion kann jedoch angenommen werden, dass diese kompensatorische Hypertrophie noch nicht in einen Zustand der Herzinsuffizienz übergeht. Die für eine Herzinsuffizienz typischen Symptome wie eine stark vergrößerte Lunge und/oder ein flüssigkeitsgefüllter Thorax wurden dementsprechend in keinem der untersuchten Tiere vorgefunden.

3.1 ER α OE-Mäuse weisen eine gesteigerte ER α -Expression auf

Die mittels des Tet-Off-Systems generierten ER α OE-Mäuse stellen eine neue Mauslinie dar, die den ER α nur in den Kardiomyozyten überexprimieren. Um die Kardiomyozyten-spezifische ER α -Überexpression der ER α OE-Mäuse zu bestätigen, wurde die Proteinexpression der verschiedenen ER α -Isoformen mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. In Abbildung 11 ist die quantitative Auswertung der ER α -Expression der 66kDa-Isoform in den linken Ventrikeln von WT- und ER α OE-Mäusen beider Geschlechter dargestellt. Von beiden Genotypen wird sowohl der Zustand bei scheinoperierten als auch infarzierten Tieren gezeigt.

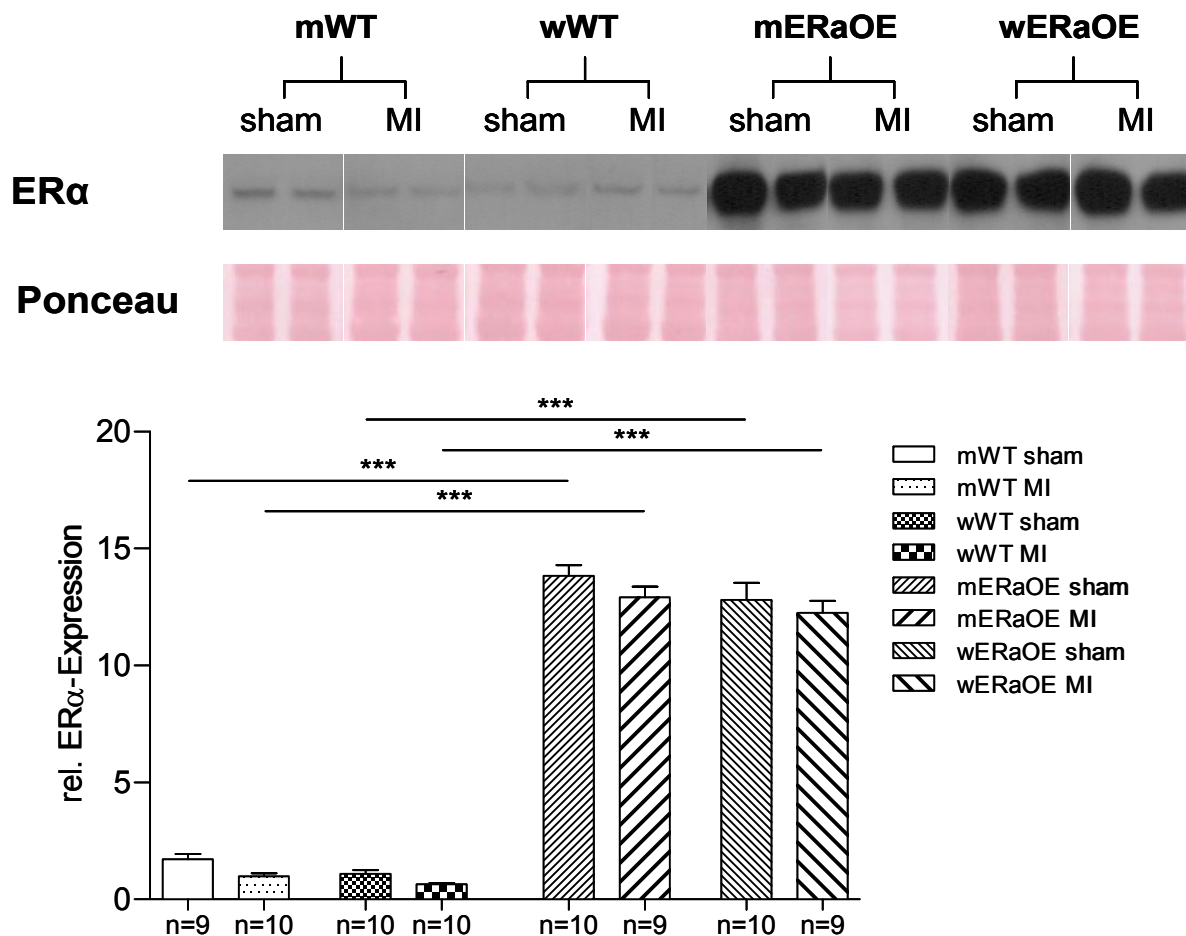


Abbildung 11: ERαOE-Mäuse zeigen eine deutliche Überexpression des ERα im Herzen. (oben) Repräsentativer Western-Blot zur Bestimmung der Proteinexpression der 66kDa-Isoform des ERα im linken Ventrikel von ERαOE- und WT-Mäusen aus allen eingesetzten Versuchsgruppen. Zur Detektion wurde ein spezifischer AK eingesetzt (G-20; Santa Cruz). (unten) Quantitative Auswertung der ERα-Proteinexpression in Relation zur Menge an aufgetragenem Protein. *** = $p < 0,001$

Die quantitative Bestimmung der 66kDa-Bande des ERα ergab, dass ERαOE-Mäuse den ERα im Herzen um das 10-12fache stärker als Wildtypen exprimieren. Die Überexpression war bei männlichen Mäusen im gleichen Maße wie bei weiblichen Tieren ausgeprägt. Durch die Infarktinduktion wurde die ERα-Expression sowohl bei WT- als auch bei ERαOE-Mäusen leicht verringert, eine signifikante Reduktion konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Um zu bestätigen, dass die erhöhte ER α -Expression auch zu einer gesteigerten Menge an aktiviertem (phosphorylierten) ER α führt, wurde mittels Western-Blot die Menge an phosphoryliertem ER α in WT- und ER α OE-Mäusen bestimmt (Abb. 12).

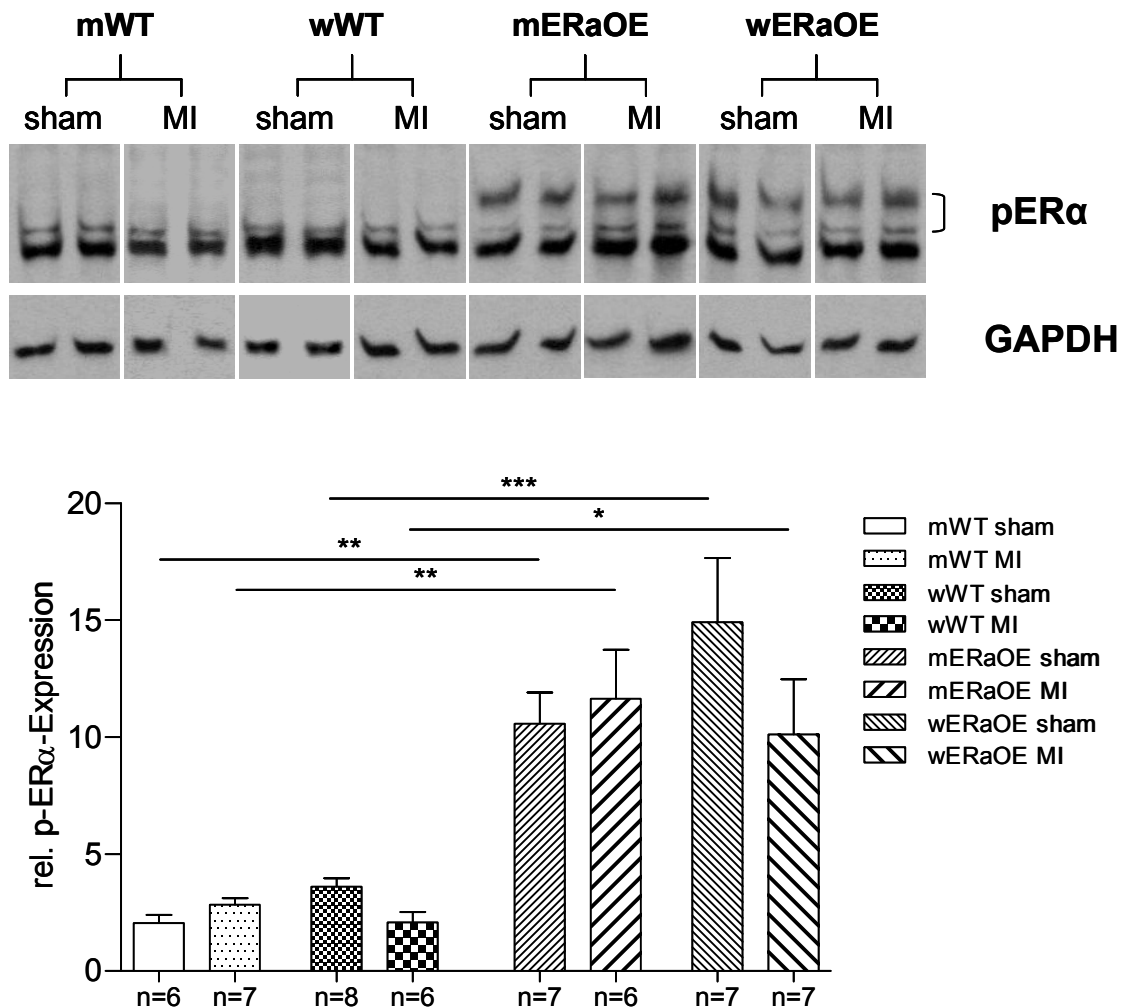


Abbildung 12: Die Menge an phosphoryliertem ER α im Herzen ist bei ER α OE-Mäusen signifikant erhöht. (oben) Repräsentativer Western-Blot zur Detektion des phosphorylierten ER α (pER α) im linken Ventrikel von ER α OE- und WT-Mäusen. Zu sehen sind bei WT-Mäusen zwei Banden, wobei die obere Bande das spezifische Signal des pER α darstellt. Bei ER α OE-Mäusen kann eine zusätzliche spezifische Bande detektiert werden, da der bei ER α OE-Mäusen „künstlich“ zugefügte ER α mit einem FLAG-Tag versehen ist. Dadurch ist dieser „künstliche“ ER α um ca. 1kDa schwerer als der endogene ER α und läuft bei der Gelelektrophorese langsamer. Zur Detektion wurde ein spezifischer AK eingesetzt (pER α (serin 118)-R; Santa Cruz). (unten) Quantitative Auswertung der pER α -Proteinexpression in Relation GAPDH. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Die quantitative Bestimmung des phosphorylierten ER α im linken Ventrikel konnte bestätigen, dass die Menge an aktiviertem ER α bei ER α OE-Mäusen im Vergleich mit WT-Mäusen um das 3-5fache erhöht ist. Die Infarktinduktion bewirkte keine Veränderungen der ER α -Phosphorylierung (Abb. 12 unten).

Mittels immunhistologischen Aufnahmen von Gewebeschnitten aus Herzen von WT- und ER α OE-Mäusen konnte die Überexpression des ER α in ER α OE-Tieren deutlich bestätigt werden (Abb. 13). Hierbei zeigte sich, dass die Lokalisation des ER α bei ER α OE-Tieren insbesondere in den Zellkernen erhöht ist.

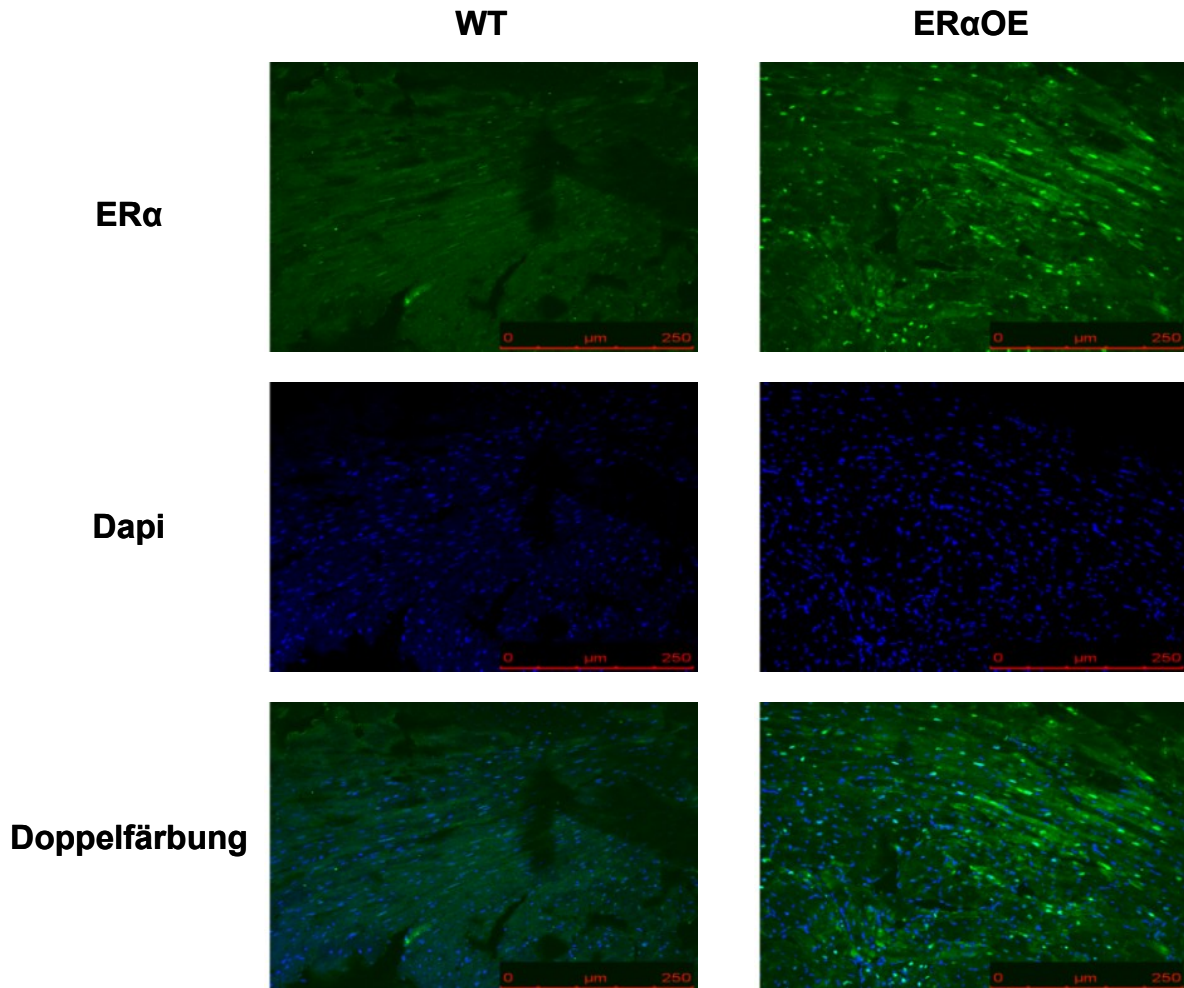


Abbildung 13: ER α OE-Mäuse weisen zusätzlich zur insgesamt gesteigerten ER α -Expression eine im Vergleich zu WT-Mäusen erhöhte nukleäre ER α -Lokalisation auf. Repräsentative Konfokalmikroskop-Aufnahmen von 3 μ m dicken Paraffinschnitten, die mit einem spezifischen ER α -Antikörper (MC-20; Santa Cruz) inkubiert wurden. Die Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI-Färbung). Skalierungsbalken 250 μ m.

3.2 Die ER α -Überexpression ist herzspezifisch

Zur Verifizierung der Kardiomyozyten-spezifischen Überexpression des ER α wurden Proteine aus verschiedenen Organen isoliert und die Proteinexpression des ER α mittels Western-Blot bestimmt. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, wird der ER α nur im linken Ventrikel (LV) der ER α OE-Mäuse überexprimiert. Im Skelettmuskel (beispielhaft *Musculus soleus*), der Lunge, der Niere und dem Uterus ist zwischen ER α OE- und WT-Mäusen kein Unterschied der ER α -Expression zu erkennen. Uterines Gewebe wurde als Positivkontrolle benutzt.

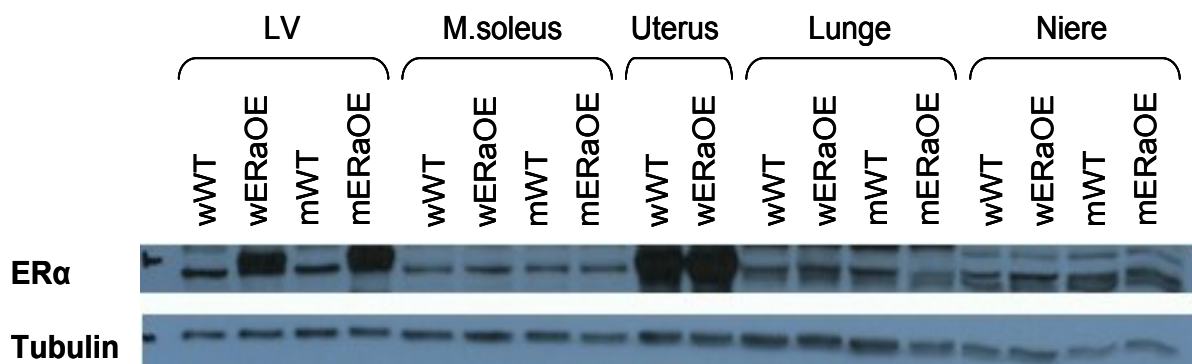


Abbildung 14: Bestätigung der herzspezifischen ER α -Überexpression in ER α OE-Mäusen. Repräsentativer Western-Blot zur Detektion des ER α (66kDa-Bande) in verschiedenen Organen von ER α OE- und WT-Mäusen. Zur Detektion wurde ein spezifischer AK eingesetzt (G-20; Santa Cruz).

3.3 Auswirkungen der Infarktinduktion auf das Überleben und die Herzfunktion

3.3.1 Die ER α -Überexpression hat keine Auswirkung auf das Überleben nach Myokardinfarkt

In allen untersuchten Gruppen war das Überleben der infarzierten Tiere geringer als jenes der scheinoperierten Tiere. Scheinoperierte Tiere überlebten in allen untersuchten Gruppen zu 92-100%.

14 Tage nach dem Myokardinfarkt wiesen weibliche Wildtyp-Mäuse mit 60% die höchste Überlebensrate auf. Im Vergleich dazu war die Überlebensrate bei männlichen Wildtypen um ca. 15% geringer. Bei ER α OE-Tieren konnte kein Geschlechterunterschied festgestellt werden und ihr Überleben war mit dem von männlichen Wildtypen vergleichbar (Abb. 15).

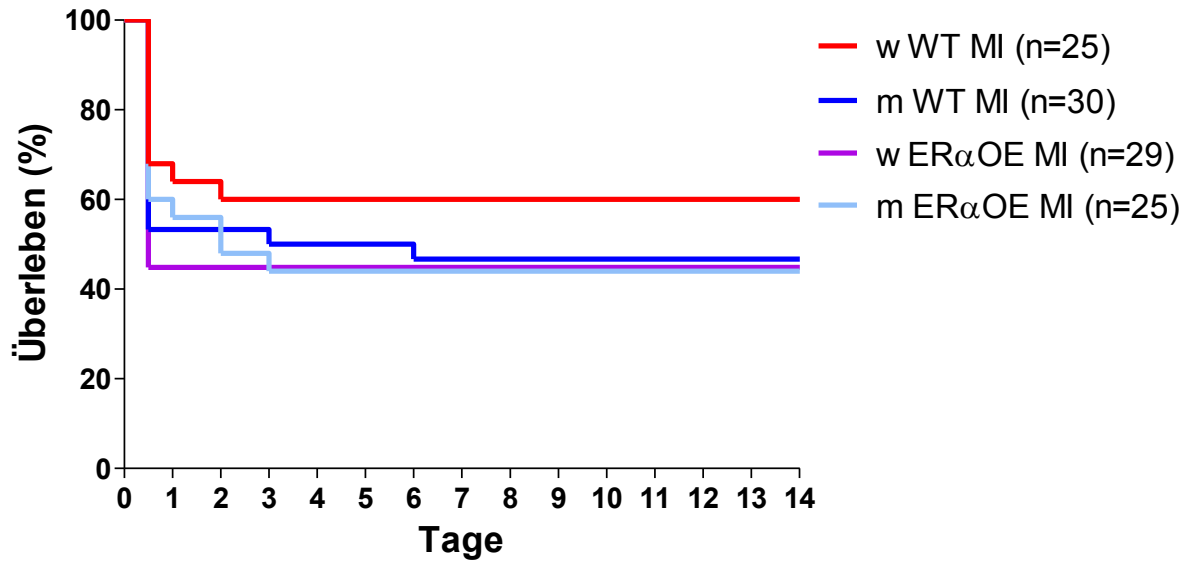


Abbildung 15: Das Überleben aller Versuchsgruppen ist nicht signifikant unterschiedlich. Überlebenskurven infarzierter Tiere bis 14 Tage nach Induktion des Herzinfarkts. Dargestellt sind sowohl Wildtyp- als auch ER α OE-Tiere beiderlei Geschlechts.

Die Mortalität innerhalb der ersten Stunden nach der Operation war hoch. Die wahrscheinlichste Todesursache hierbei war das Auftreten einer fatalen Herzarrhythmie. Insbesondere weibliche ER α OE-Tiere waren anfällig dafür. Sie starben zu 55,2% (16 von 29 operierten Tieren) innerhalb der ersten Stunden nach der Operation, während weibliche WT-Tiere nur zu 32,0% (8 von 25 operierten Tieren) starben. Auch bei männlichen Tieren trat der schnelle postoperative Herztod häufig auf, jedoch war kein wesentlicher Unterschied zwischen den Genotypen zu beobachten.

Bis zum 3.Tag nach Infarktinduktion kam es bei WT-Weibchen sowie bei Männchen beider Genotypen zu Todesfällen, für die keine offensichtliche Todesursache festgestellt werden konnte. Möglicherweise waren hier Arrhythmien oder ein sog. *low cardiac output*-Syndrom, d.h. eine Unterversorgung des Körpers mit Sauerstoff und Nährstoffen durch die reduzierte Herzleistung für den Tod verantwortlich. Zwischen dem 2. und 6.Tag nach der Operation starben 4 männliche Tiere infolge von Herzrupturen. Hiervon waren zwei ER α OE-Mäuse und zwei WT-Mäuse.

Obwohl die akute Mortalität bei ER α OE-Weibchen am höchsten ist, fällt auf, dass bei ihnen im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen nach der akuten Phase der Infarktinduktion keine weiteren Todesfälle mehr auftraten. Somit zeigten die weiblichen ER α OE-Tiere nach Überleben der akuten Phase ein besseres Überleben als die weiblichen WT-Tiere bzw. männliche Tiere beiderlei Genotyps (Abb. 16).

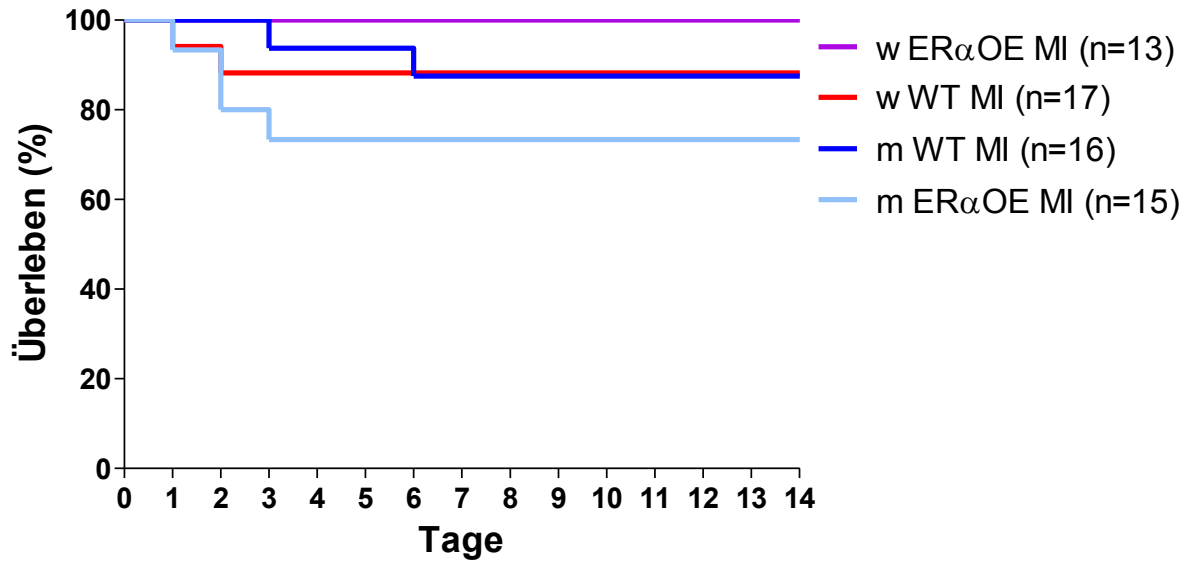


Abbildung 16: Nach der akuten Phase des MI überleben weibliche ER α OE-Mäuse vollständig. Überlebenskurven infarzierter Tiere bis 14 Tage nach Induktion des Herzinfarkts ohne die Tiere, die innerhalb der akuten Phase verstorben sind. Dargestellt sind sowohl Wildtyp- als auch ER α OE-Tiere beiderlei Geschlechts.

3.3.2 Die Infarktgröße ist bei ER α OE-Mäusen tendenziell geringer

Die Infarktgrößen wurden mittels Echokardiographie ermittelt. Bei der Berechnung wurden entsprechend der Literatur (vgl. Pelzer 2005) Tiere mit kleinen Infarkten (<10% des linksventrikulären Umfangs) ausgeschlossen. Beim Vergleich der WT-Tiere mit den ER α OE-Tieren zeigten ER α OE-Tiere kleinere Infarkte als WT-Tiere. Möglicherweise aufgrund der zu geringen Anzahl von Tieren in den Versuchsgruppen konnte jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden (Abb. 17).

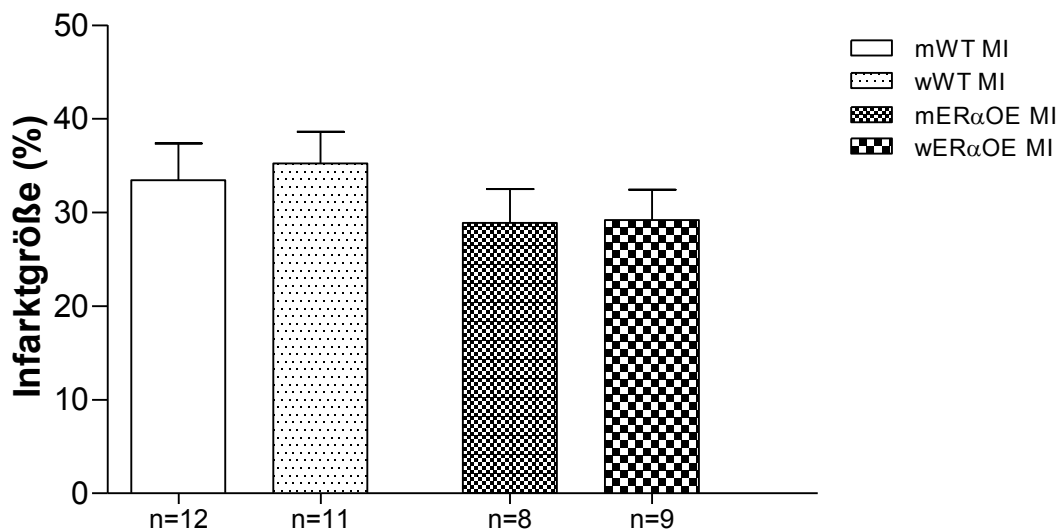


Abbildung. 17: ER α OE-Mäuse haben tendenziell kleinere Infarkte als WT-Mäuse

3.3.3 Die systolische Herzfunktion ist bei ER α OE-Mäusen im Grundzustand gegenüber Wildtypen reduziert

Auf Basalniveau wiesen ER α OE-Tiere im Vergleich zu Wildtypen eine niedrigere Auswurffraktion (EF) auf (siehe Abb. 18). Dieser bei der Echokardiographie gemessene Parameter ist allgemein als Marker für die systolische Herzfunktion anerkannt. Er beschreibt das Blutvolumen, welches bei jedem Herzschlag aus dem linken Ventrikel ausgestoßen wird. Hierbei wird das ausgestoßene Blutvolumen in Relation zum gesamten Volumen des linken Ventrikels gesetzt. Während scheinoperierte WT-Mäuse eine EF von 62% (Männchen) bzw. 66% (Weibchen) aufwiesen, war sie bei ER α OE-Mäusen mit 52% (Männchen) bzw. 49% (Weibchen) niedriger.

Nach der Infarktinduktion war die EF in allen Versuchsgruppen gegenüber dem Basalniveau reduziert (vgl. Abb. 18). So sank die EF bei Wildtypen um ca. 30% (Männchen 62%→33%; Weibchen 66%→32%). Auch bei ER α OE-Mäusen führte der Infarkt zur Verminderung der EF (Männchen 52%→27%; Weibchen 49%→34%). Die Reduktion der EF nach dem Infarkt war bei WT-Mäusen und ER α OE-Mäusen statistisch signifikant.

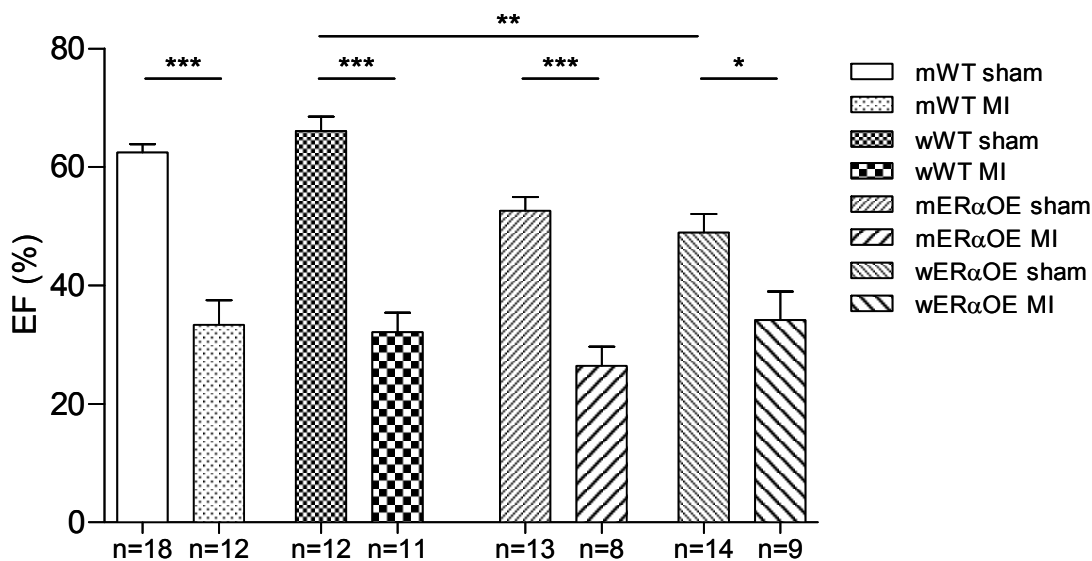


Abbildung 18: ER α OE-Mäuse zeigen initial eine im Vergleich mit Wildtypen verminderte Ejektionsfraktion. Die Infarktinduzierung bewirkt eine Abnahme der Ejektionsfraktion in allen untersuchten Versuchsgruppen. Linksventrikuläre Auswurffraktion infarzierter und scheinoperierter Tiere 14 Tage nach Operation. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Zur Beschreibung der Funktion des Herzens gibt es neben der EF auch andere experimentelle Parameter. Um die adäquate Versorgung des gesamten Körpers mit Blut zu beschreiben, ist das pro Minute vom Herzen ausgestoßene Blutvolumen (Herzzeitvolumen, *left ventricular cardiac output* [LVCO]) ein geeigneter Indikator. Das LVCO ist ein Produkt aus Schlagvolumen (LVSV) und der Herzrate.

Das Schlagvolumen ist die Differenz zwischen dem diastolischen ($LVVol_D$) und systolischen Volumen ($LVVol_S$). Zwar waren diese linksventrikulären Volumina bei ER α OE-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen im Grundzustand erhöht, allerdings war das Schlagvolumen beider Genotypen vergleichbar (siehe Tabelle 4). Da die Herzrate bei allen Versuchsgruppen ähnlich war, war auch das LVCO von WT- und ER α OE-Mäusen annähernd gleich. Lediglich durch die Infarktinduktion war ein tendenziell vermindertes LVCO zu beobachten (siehe Tabelle 4).

Zusammenfassend wiesen ER α OE-Tiere im Grundzustand eine Dilatation des linken Ventrikels auf und die Kontraktilität war, wie anhand der EF gezeigt, gegenüber WT-Tieren eingeschränkt. Allerdings blieb die Versorgung des Körpers mit Blut (LVCO) bei ER α OE-Tieren ähnlich wie bei WT-Tieren gewährleistet. Die Infarktinduktion bewirkte eine signifikante Reduktion der EF in allen Gruppen, aber die anfänglich beobachteten Genotyp-spezifischen Unterschiede wurden aufgehoben.

Tabelle 4: Parameter der linksventrikulären Funktion in scheinoperierten und infarzierten Tieren

Genotyp	WT				ER α OE			
	Männlich		Weiblich		Männlich		Weiblich	
Behandlung	sham (n=18)	MI (n=12)	sham (n=12)	MI (n=11)	sham (n=13)	MI (n=8)	sham (n=14)	MI (n=9)
Körpergewicht [g]	28,17 \pm 0,60	28,58 \pm 0,78	22,03 \pm 0,52	21,48 \pm 0,54	27,64 \pm 0,57	27,53 \pm 0,75	22,33 \pm 0,52	21,31 \pm 0,53
TL [mm]	16,86 \pm 0,09	16,81 \pm 0,16	16,32 \pm 0,13	16,35 \pm 0,16	16,91 \pm 0,10	16,54 \pm 0,16	16,66 \pm 0,11	16,39 \pm 0,13
LVM [mg]	113,97 \pm 2,10	121,10 \pm 4,31	84,69 \pm 2,97	90,94 \pm 1,99	134,98 [§] \pm 5,91	130,90 \pm 4,27	103,66 [§] \pm 3,22	105,93 \pm 4,07
LVM/TL [mg/mm]	6,76 \pm 0,13	7,20 \pm 0,24	5,19 \pm 0,17	5,57 \pm 0,14	7,98 [§] \pm 0,34	7,90 [§] \pm 0,23	6,23 [§] \pm 0,20	6,46 \pm 0,24
LVW [mm]	0,71 \pm 0,01	0,62* \pm 0,01	0,63 \pm 0,02	0,57* \pm 0,01	0,73 \pm 0,01	0,65* \pm 0,02	0,64 \pm 0,01	0,62 \pm 0,02
LVVol _D [μ l]	52,71 \pm 2,14	95,77* \pm 8,95	40,90 \pm 1,81	67,43* \pm 6,14	63,56 [§] \pm 3,52	94,53* \pm 5,32	59,75 [§] \pm 3,25	74,64 \pm 4,76
LVVol _S [μ l]	19,98 \pm 1,18	67,74* \pm 10,72	14,01 \pm 1,26	47,51* \pm 6,64	31,63 [§] \pm 2,93	69,40* \pm 5,55	31,23 [§] \pm 3,24	50,50 \pm 6,30
Herzrate [min ⁻¹]	495,8 \pm 10,12	515,8 \pm 12,65	480,3 \pm 14,80	525,5 \pm 12,36	462,5 \pm 20,21	522,3 \pm 38,54	472,5 \pm 11,66	459,6 \pm 20,26
LVSV [μ l]	32,73 \pm 1,28	28,03 \pm 2,35	26,89 \pm 1,31	19,92 \pm 1,28	31,45 \pm 1,90	24,65* \pm 3,03	28,52 \pm 1,65	24,14 \pm 2,53
LVCO [ml/min]	16,16 \pm 0,71	14,72 \pm 1,39	13,11 \pm 0,86	10,41 \pm 0,64	15,33 \pm 1,13	12,42 \pm 1,32	13,49 \pm 1,01	10,25 \pm 1,20

TL: Tibialänge; LVM: Linksventrikuläre Masse; LVW: LV Wanddicke; LVVol_D, LVVol_S: Diastolisches bzw. Systolisches LV Volumen; LVSV: LV Schlagvolumen; LVCO: LV cardiac output. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. § p<0.05 ER α OE vs. WT; * = p<0.05 MI vs. sham.

3.4 ER α OE-Mäuse weisen eine Herzhypertrophie auf

3.4.1 Das Herzgewicht und die linksventrikuläre Masse der ER α OE-Mäuse ist erhöht

ER α OE-Mäuse wiesen ein im Vergleich zu Wildtypen erhöhtes Herzgewicht auf. Auf Basalniveau war das relative Herzgewicht bei ER α OE-Mäusen (Männchen: 5,69 mg/g; Weibchen: 5,71 mg/g) um ~20% gegenüber Wildtypen (Männchen: 4,98 mg/g; Weibchen: 4,72 mg/g) erhöht. Die Infarktinduktion führte zu keiner signifikanten Veränderung des Herzgewichts in allen untersuchten Gruppen (Abb. 19).

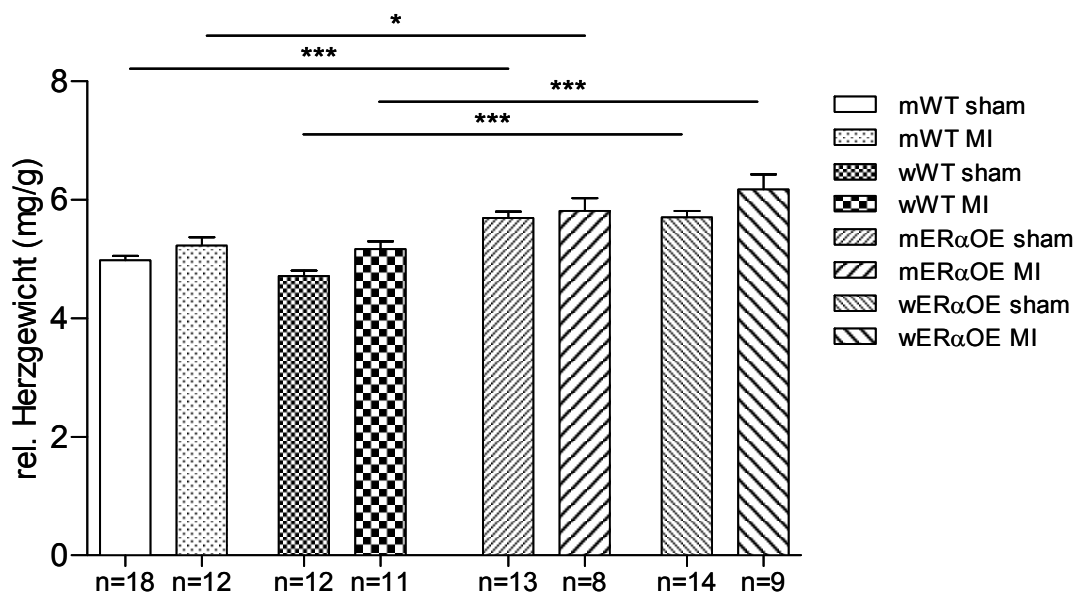


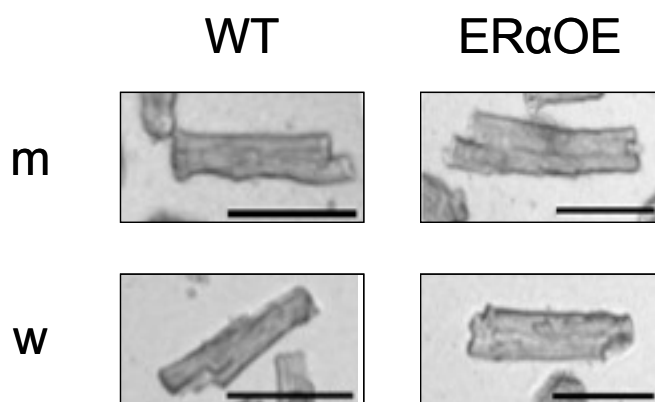
Abbildung 19: ER α OE-Mäuse zeigen ein im Vergleich mit Wildtypen erhöhtes Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

Wie in Tabelle 4 angegeben, war auch die relative linksventrikuläre Masse in ER α OE-Tieren im Grundzustand erhöht, was sowohl mit einer tendenziellen Zunahme der durchschnittlichen linksventrikulären Wanddicke als auch einem gesteigerten linksventrikulären Volumen (LVVol_S, LVVol_D siehe Tabelle 4) einherging. Die Infarktsetzung bewirkte unabhängig vom Genotyp eine tendenzielle Zunahme des linksventrikulären Gewichts. Interessanterweise konnte nach MI bei allen Gruppen außer den weiblichen ER α OE-Mäusen eine signifikante Zunahme der systolischen bzw. diastolischen Volumina bei gleichzeitig verringerter Wanddicke festgestellt werden.

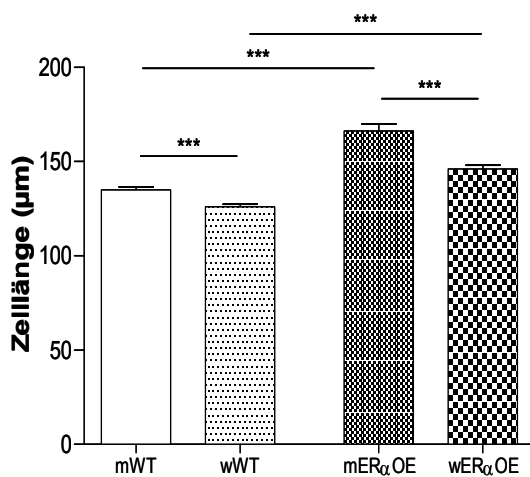
3.4.2 Die Hypertrophie der ER α OE-Mäuse geht mit einem Längenwachstum der Kardiomyozyten einher

Die Untersuchung isolierter Kardiomyozyten ergab, dass ER α OE-Mäuse im Grundzustand größere Kardiomyozyten als WT-Mäuse aufwiesen (Abb. 20A). Die durchschnittliche Länge der ER α OE-Kardiomyozyten war im Vergleich zu WT-Kardiomyozyten um ~20% erhöht (mWT: 134,9 μ m bzw. wWT: 126,0 μ m; mER α OE: 166,2 μ m bzw. wER α OE: 146,0 μ m) (Abb. 20B). Dagegen war bei der Breite der Kardiomyozyten kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen (mWT: 29,4 μ m bzw. wWT: 26,4 μ m; mER α OE: 29,8 μ m bzw. wER α OE: 26,1 μ m) (Abb. 20C).

A



B



C

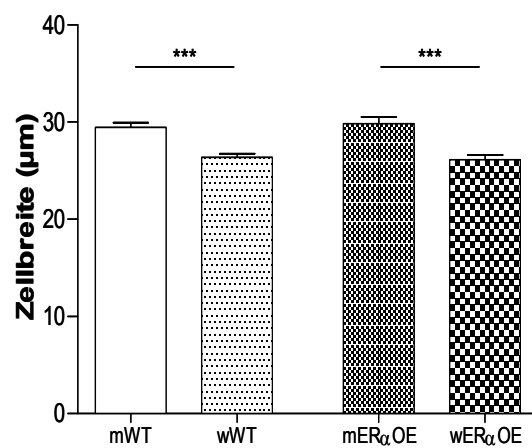


Abbildung 20: (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen isolierter Kardiomyozyten von WT- und ER α OE-Mäusen (Skalierungsbalken 100 μ m). **(B-C)** Messung der diastolischen Kardiomyozytenlänge bzw. -breite der WT- und ER α OE-Mäuse. Untersucht wurden jeweils 100-300 Kardiomyozyten aus 3-4 Tieren pro Gruppe. *** = $p < 0,001$

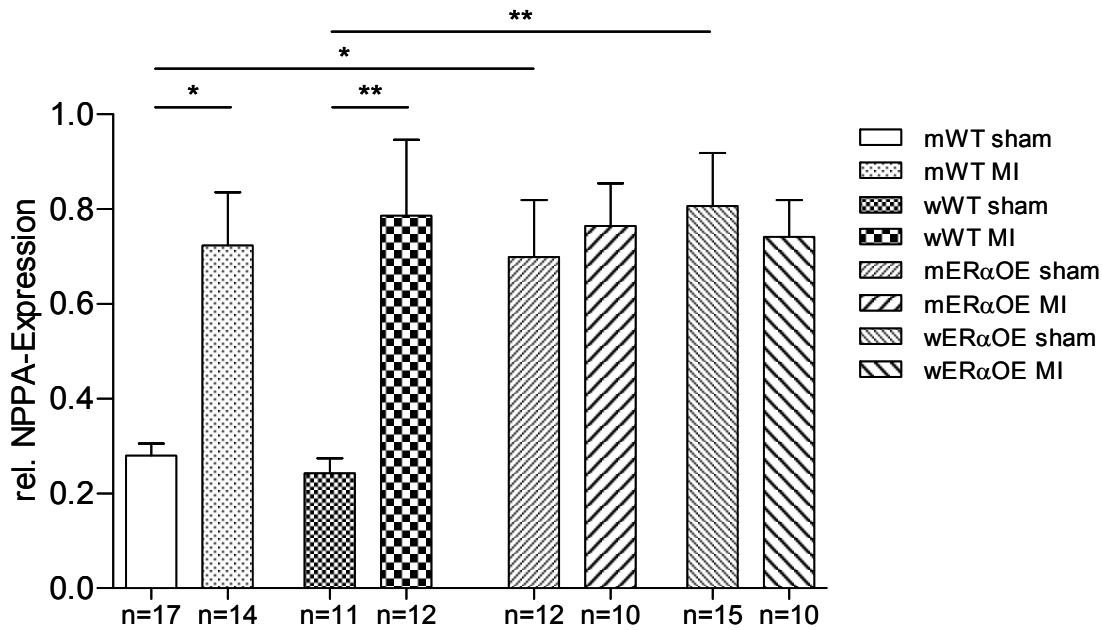
3.4.3 Die Expression von Hypertrophiemarkern ist bei ER α OE-Mäusen im Grundzustand erhöht

ER α OE-Mäuse zeigten bereits im Grundzustand ein im Vergleich zu Wildtypen erhöhtes Herzgewicht und wiesen ein vergrößertes linksventrikuläres Volumen auf. Wegen dieses Befundes sollte geklärt werden, ob damit auch eine veränderte Expression typischer Hypertrophie-Markergene einhergeht. Als eine Auswahl dieser Gene wurde daher die Expression der Markergene NPPA, NPPB, Myh6 und Myh7 mit Hilfe der RT-PCR quantitativ bestimmt.

Im Vergleich mit WT zeigten ER α OE-Tiere im Grundzustand sowohl für NPPA als auch NPPB eine signifikant erhöhte Expression. So war die NPPA-Expression um das ~3fache, die NPPB-Expression um das ~4fache gesteigert (vgl. Abb. 21A und 21B).

Überraschender Weise hatte die Infarktinduktion bei ER α OE-Mäusen fast keinen Effekt auf die Expression beider MI-Markergene. Demgegenüber stieg bei WT-Mäusen sowohl die NPPA- als auch die NPPB-Expression gegenüber dem Grundzustand signifikant an und sie erreichten dasselbe Niveau wie ER α OE-Mäuse (vgl. Abb. 21A und 21B).

A



B

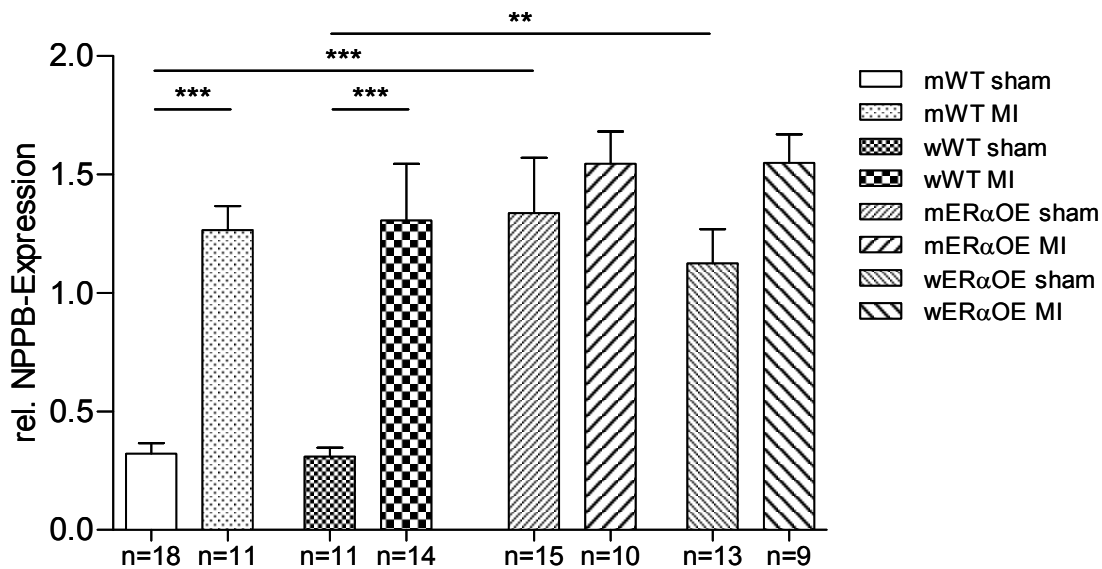


Abbildung 21: (A) NPPA- und **(B)** NPPB-Expression in allen untersuchten Tiergruppen. Genexpression jeweils in Relation zu HPRT in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Bei adulten Mäusen wird im gesunden Myokard eher Myh6, unter pathologischen Umständen dagegen vermehrt Myh7 exprimiert. Um einen pathologischen oder nicht pathologischen Zustand im adulten Myokard zu beschreiben, bietet es sich daher an, dass Verhältnis beider Moleküle anzuzeigen. Bei scheinoperierten Tieren exprimierten WT-Mäuse vorwiegend Myh6 (Verhältnis Myh6 zu Myh7: 5:1), während ER α OE-Mäuse Myh6 und Myh7

gleichermaßen exprimierten. Nach Infarkt trat bei WT-Tieren Myh7 als vorwiegende Isoform auf (Verhältnis Myh6 zu Myh7: 1:2). ER α OE-Tiere zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Ausgangszustand (Abb. 22).

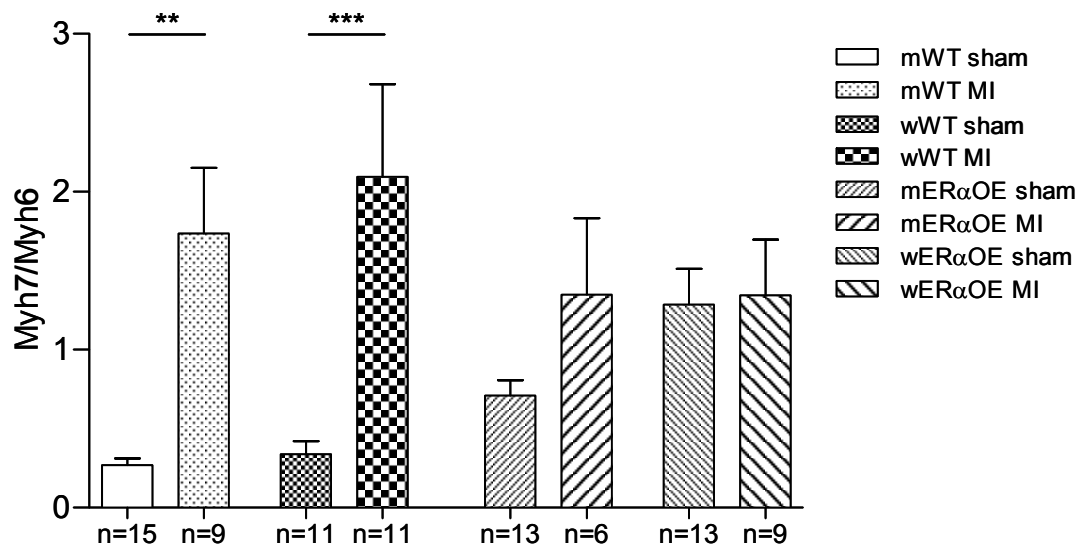


Abbildung 22: Genexpression von Myh7 in Relation zu Myh6 in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass die Herzvergrößerung der ER α OE-Mäuse auch mit einer erhöhten Expression der Hypertrophiemarker NPPA, NPPB und Myh7 einhergeht. Das gleichzeitig reduzierte Niveau der Myh6-Expression deutet auf eine pathologische Form der Hypertrophie hin. Auffällig ist allerdings, dass die Infarktinduktion bei ER α OE-Mäusen nicht die erwarteten Veränderungen bewirkt. Während WT-Mäuse mit dem Wechsel zu Myh7 ein Zeichen für eine pathologische Entwicklung zeigen, scheinen ER α OE-Tiere in einer kompensatorischen Hypertrophie zu verharren, ohne in einen pathologischen Zustand überzugehen.

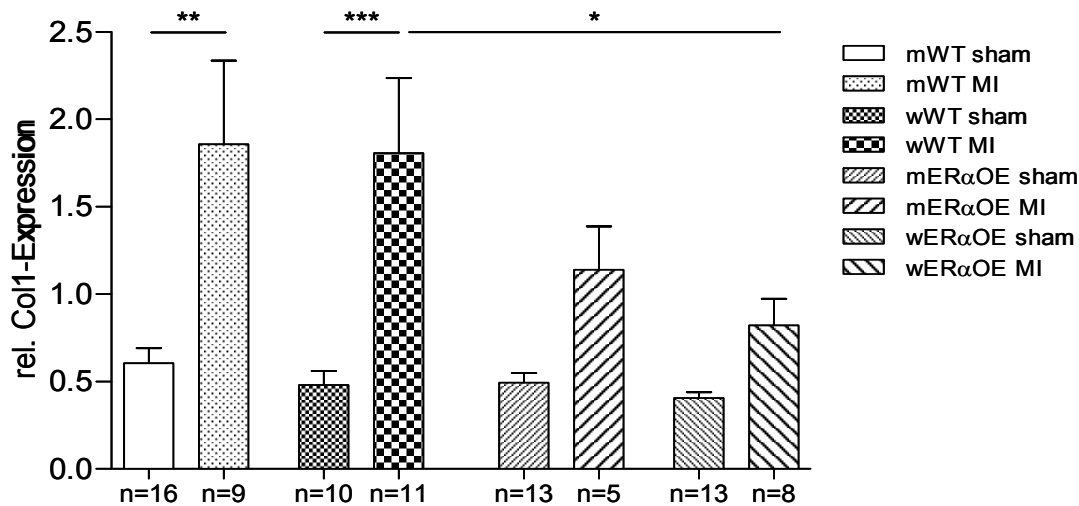
3.5 Die ER α -Überexpression vermindert die Expression von Remodeling-assoziierten Genen nach einem Myokardinfarkt

Nach einem Infarkt kommt es im Herzen nach kurzer Zeit zum Gewebeumbau, dem sog. Remodeling. Hierbei wird abgestorbenes Gewebe abgebaut und durch Kollagenablagerungen ersetzt. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob das Remodeling bzw. der Grad der Fibrosierung des Remote-Bereichs nach einem Infarkt durch die Überexpression des ER α beeinflusst wird. Hierzu wurde die Expression der Fibrose-Markergene Col1 und Col3 sowie von MMP2 mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Im Grundzustand konnte zwischen ER α OE- und WT-Tieren kein Unterschied in der Col1- und der Col3-Expression beobachtet werden (Abb. 23A und 23B). Nach der Infarktinduktion stieg die Expression beider Gene in WT-Tieren im *Remote*-Bereich um das etwa 3-4fache

gegenüber dem Ausgangsniveau an. Auch bei infarzierten ER α OE-Tieren war im *Remote*-Bereich eine Induktion von Col1 und Col3 festzustellen. Allerdings war die Expression beider Gene im Vergleich zu Grundzustand nur ungefähr doppelt so hoch (Abb. 23A und 23B). Daher wiesen weibliche ER α OE-Tiere nach Infarkt eine gegenüber WT-Weibchen signifikant geringere Col1- und Col3-Expression auf.

A



B

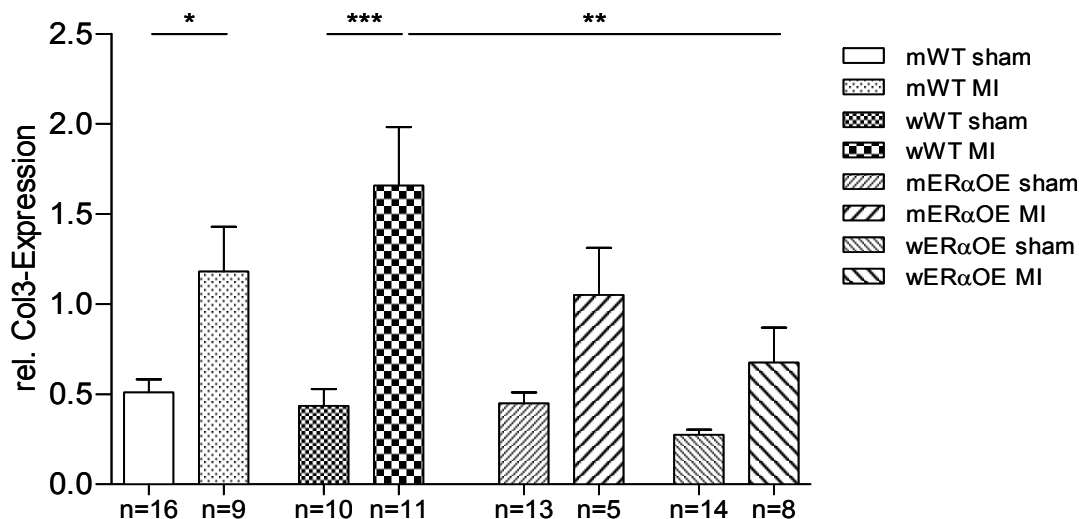


Abbildung 23: (A) Expression von Col1 und (B) Col3 in Relation zu HPRT. Untersucht wurden infarzierte (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierte Tiere 14 Tage nach Operation. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Ähnlich wie für die Kollagene konnte auch für die MMP2, die am Gewebeabbau beteiligt ist, im Grundzustand kein Unterschied der Expression zwischen ER α OE- und WT-Mäusen festgestellt werden (Abb. 24). Nach Infarktinduktion stieg die Expression nur in WT-Tieren

signifikant an, während dagegen in ER α OE-Tieren nur eine tendenziell erhöhte Expression beobachtet werden konnte (Abb. 24).

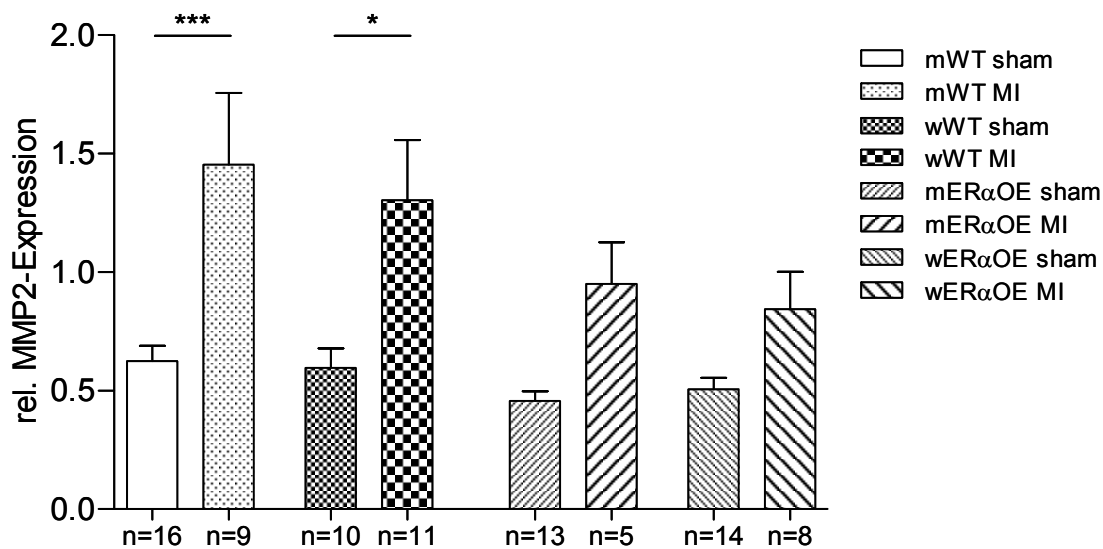


Abbildung 24: Genexpression von MMP2 in Relation zu HPRT in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hypertrophie der ER α OE-Tiere nicht mit einer Fibrosierung des Myokards einhergeht. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die ER α -Überexpression einen signifikanten Expressionsanstieg Remodeling-assoziiierter Gene nach MI verhindern kann.

3.6 ER α OE-Mäuse zeigen im Grundzustand eine reduzierte Expression von Ca²⁺-Signaling-assoziierten Genen

Kennzeichen für das Remodeling nach einem Infarkt sind u. a. die veränderte Expression und Aktivierung von Ca²⁺-Kanälen und daraus resultierend eine abnormale intrazelluläre Ca²⁺-Verteilung. Der wichtigste Ca²⁺-Speicher innerhalb eines Kardiomyozyten stellt das sarkoplasmatische Retikulum dar. Die Untersuchung der Expression von sarkoplasmatischen Ca²⁺-Kanälen und ihren Inhibitoren sollte klären, ob die ER α -Überexpression das veränderte Ca²⁺-Signaling nach einem Infarkt beeinflussen kann. Daher wurde die Expression von Ryr2 sowie von Serca2a und ihrem Inhibitor PLN mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Die Expression von Ryr2, der Ca²⁺-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol transportiert, war in ER α OE-Tieren beiderlei Geschlechts im Grundzustand signifikant gegenüber Wildtypen reduziert und wurde durch die Infarktsetzung nicht beeinflusst, während WT-Tiere nach Infarkt eine tendenziell reduzierte Expression zeigten (Abb. 25).

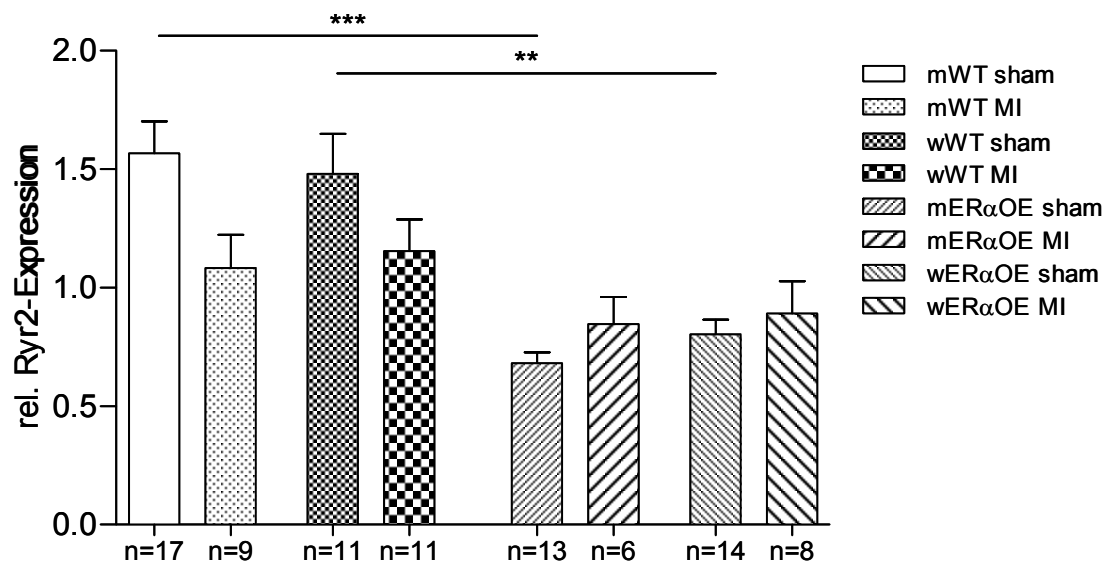


Abbildung 25: Genexpression von Ryr2 in Relation zu HPRT in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Serca2a steuert die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen ins sarkoplasmatische Retikulum. Die Aktivität dieses Ionenkanals wird durch PLN reguliert. Durch die Bindung von phosphoryliertem PLN wird Serca2a inhibiert. Nicht phosphoryliertes PLN kann nicht an Serca2a binden und Serca2a bleibt aktiv.

Die Expressionsanalyse beider Gene ergab ein ähnliches Bild wie für die Expression von Ryr2. Sowohl die Expression von Serca2a als auch PLN war in ERαOE-Tieren beiderlei Geschlechts im Vergleich zu Wildtypen im Grundzustand signifikant reduziert und die Infarktinduktion bewirkte keine Veränderungen. WT-Tiere zeigten dagegen nach Infarkt eine signifikant reduzierte Serca2a-Expression und eine tendenziell reduzierte PLN-Expression (Abb. 26A und 26B).

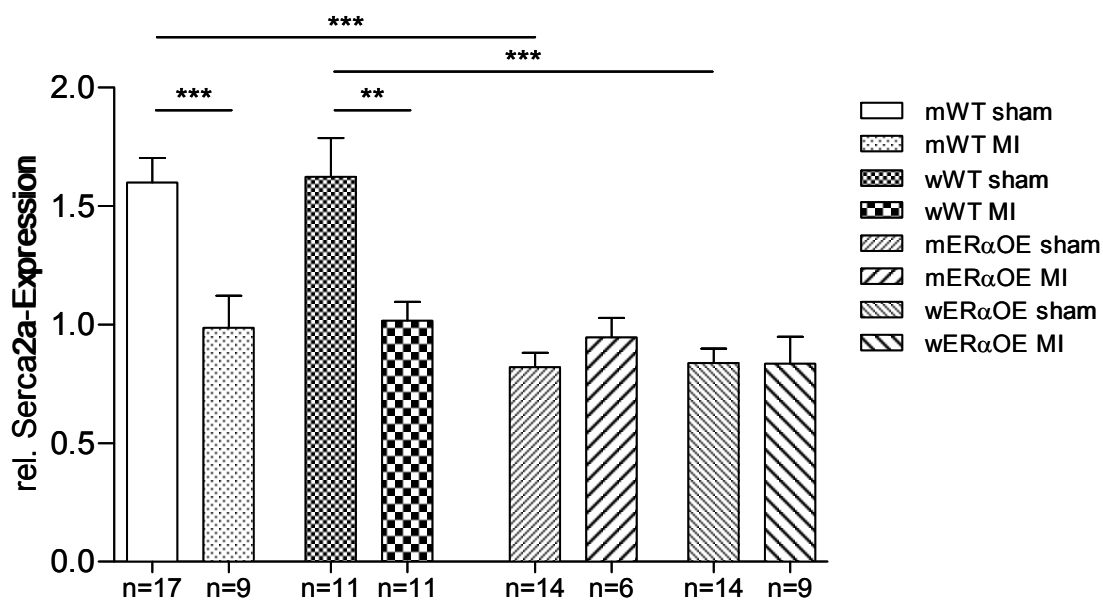
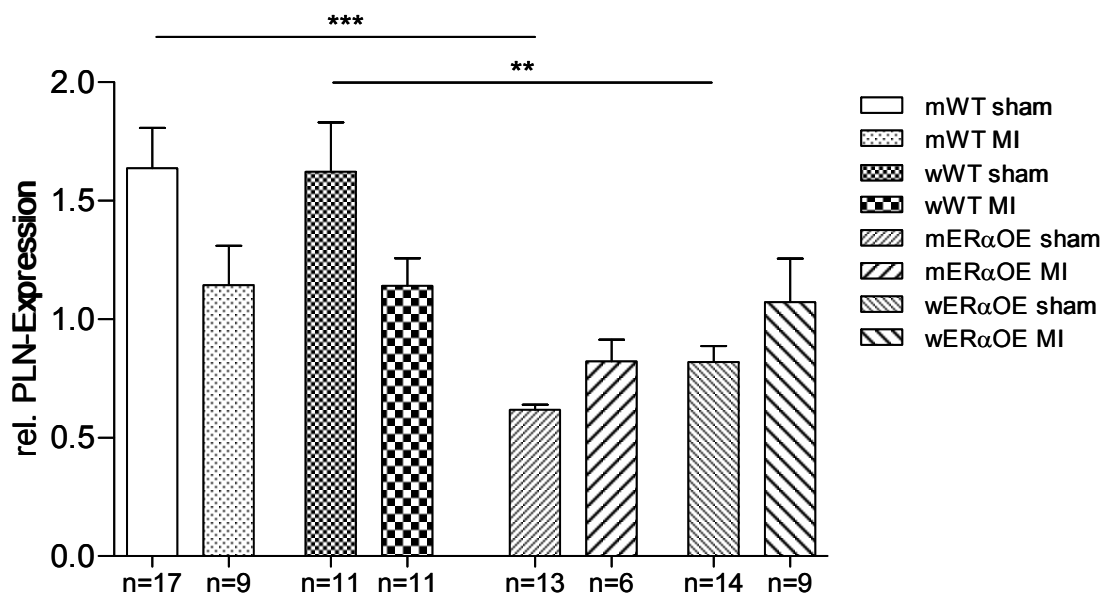
A**B**

Abbildung 26: Genexpression von Serca2a (**A**) und PLN (**B**) in Relation zu HPRT in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Diese Analysen zeigen, dass ER α OE-Mäuse im Grundzustand eine vergleichsweise geringe Expression von Ca²⁺-signaling-assoziierten Genen aufweisen. Im Gegensatz zu WT-Tieren bewirkte die Infarktinduktion bei ihnen keine Expressionsreduktion, aber die Expression der untersuchten Gene blieb bei ER α OE-Tieren auch nach Infarkt tendenziell geringer als bei WT-Tieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass die ER α -Überexpression möglicherweise zu einer erhöhten zytosolischen Ca²⁺-Konzentration führt.

3.7 Auswirkung der ER α -Überexpression auf die Biogenese, Funktion und strukturelle Integrität der Mitochondrien vor und nach Infarktinduktion

Der Befund, dass der ER α in den Mitochondrien lokalisiert ist (Chen et al., 2004, Pedram et al., 2006) und dass das Fehlen des ER α nach I/R zur Schädigung der Mitochondrien führt (Zhai et al., 2000a), veranlasste uns zur Annahme, dass eine Überexpression des ER α zur besseren Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Mitochondrien nach einem Herzinfarkt führt. Zur Bestimmung der Mitochondrienfunktion nach Infarktinduktion wurden sowohl der Gehalt an mitochondrialer DNA als auch die Gen- und Proteinexpression verschiedener mitochondrialer Marker untersucht. Außerdem wurde anhand permeabilisierter Muskelfasern aus linksventrikulären Proben operierter Mäuse die respiratorische Aktivität der Mitochondrien gemessen. Zur genaueren Untersuchung der Mitochondrienmorphologie wurden zum Schluss elektronenmikroskopische Aufnahmen infarzierter und scheinoperierter Wildtyp- und ER α OE-Mäuse angefertigt.

3.7.1 Die ER α -Überexpression steigert den Gehalt an mitochondrialer DNA

Aus linksventrikulären Biopsien wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR der Gehalt an mitochondrialer DNA (mtDNA) bestimmt. Zur Bestimmung wurden die mitochondrial kodierten Gene ND1 (NADH-Reduktase 1; Untereinheit des ersten Komplexes der Atmungskette) und Cox1 (Cytochrom-Oxidase; Untereinheit des dritten Komplexes der Atmungskette) genutzt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die DNA-Menge von ND1 als auch von Cox1 in ER α OE-Tieren um das 2-3fache gegenüber Wildtypen gesteigert ist. Die Infarktinduktion bewirkte eine Reduktion des mtDNA-Gehalts beider untersuchten Gene, jedoch blieb die Expression in ER α OE-Tieren weiterhin gegenüber WT erhöht (Abb. 27A und 27B).

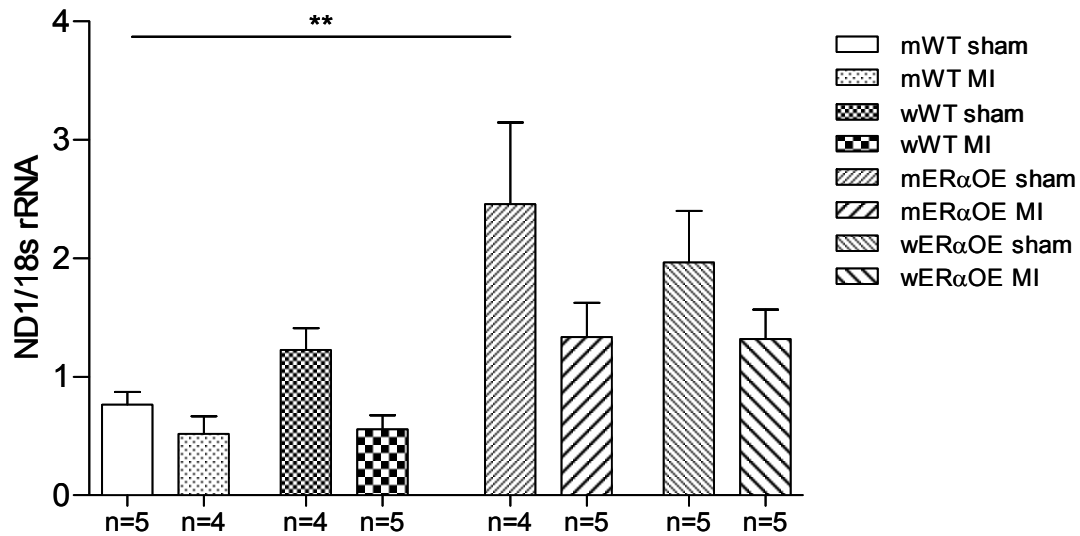
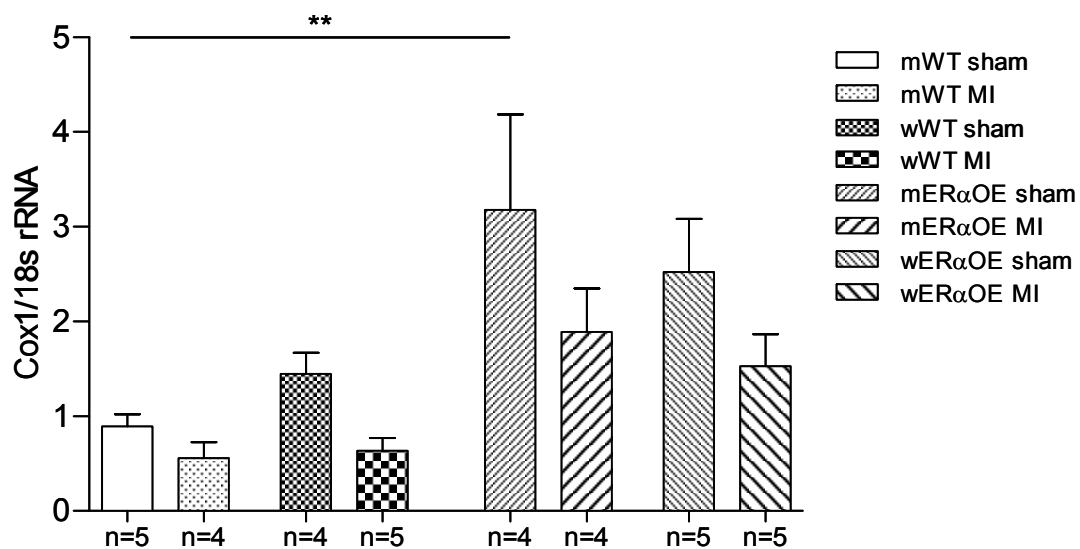
A**B**

Abbildung 27: Menge der mtDNA von ND1 (**A**) und der Cox1 (**B**) relativ zur nukleären 18s rRNA. Die Menge der mtDNA wurde mittels real time-PCR aus linksventrikulären Biopsien infarzierter und scheinoperierter Tiere quantifiziert. ** = $p < 0,01$.

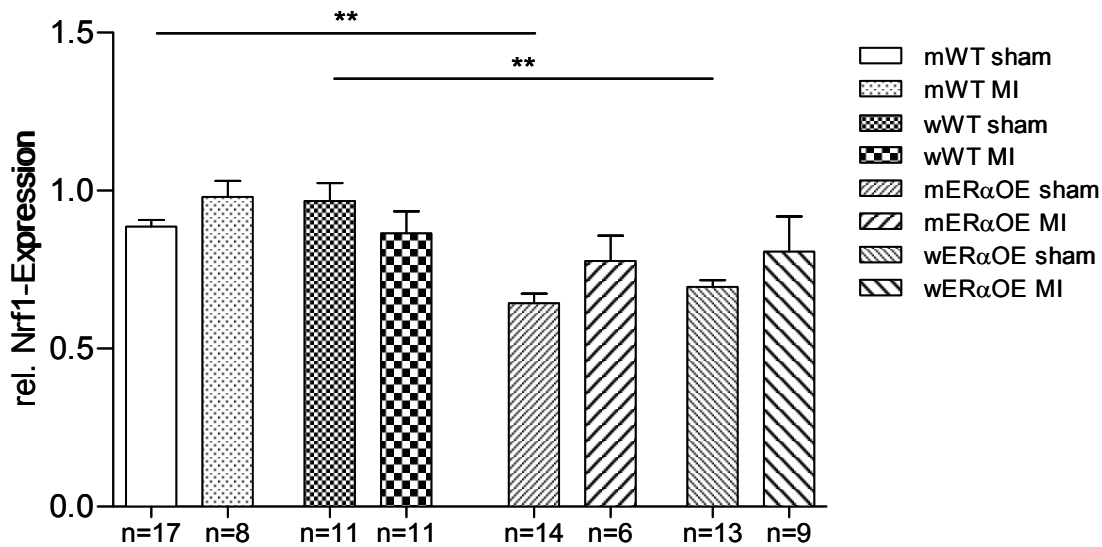
Diese Befunde deuten darauf hin, dass die ERα-Überexpression entweder zu einer vermehrten Mitochondrienbiogenese oder zu einer erhöhten Kopienanzahl mitochondrialer DNA pro Mitochondrium führt.

3.7.2 Die ER α -Überexpression reduziert die Expression von Genen, die mit der Biogenese von Mitochondrien assoziiert sind

Um zu überprüfen, ob der erhöhte Gehalt an mitochondrialer DNA in ER α OE-Tieren auf eine gesteigerte Mitochondrienbiogenese zurückzuführen ist, wurde im Folgenden die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der mitochondrialen Biogenese stehen durch RT-PCR analysiert. Hierbei wurde zunächst die Expression von Nrf1, Nrf2 und PGC1 α untersucht. Alle drei Faktoren beeinflussen im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren die Proteinexpression von Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette sowie des Transkriptionsfaktors TFAM, welcher die Replikation von mitochondrialer DNA unterstützt. Außerdem wurde die Expression von Mef2a untersucht. Mef2a ist unter anderem an der Regulation der Expression von PGC1 α beteiligt.

Die Analyse von Nrf1 ergab, dass die Expression bei ER α OE-Mäusen insbesondere vor Infarktinduktion gegenüber den Wildtyp-Mäusen reduziert ist (Abb. 28A). Nrf2 ist nur bei männlichen scheinoperierten ER α OE-Mäusen signifikant geringer exprimiert als bei männlichen WT-Tieren (Abb. 28B).

A



B

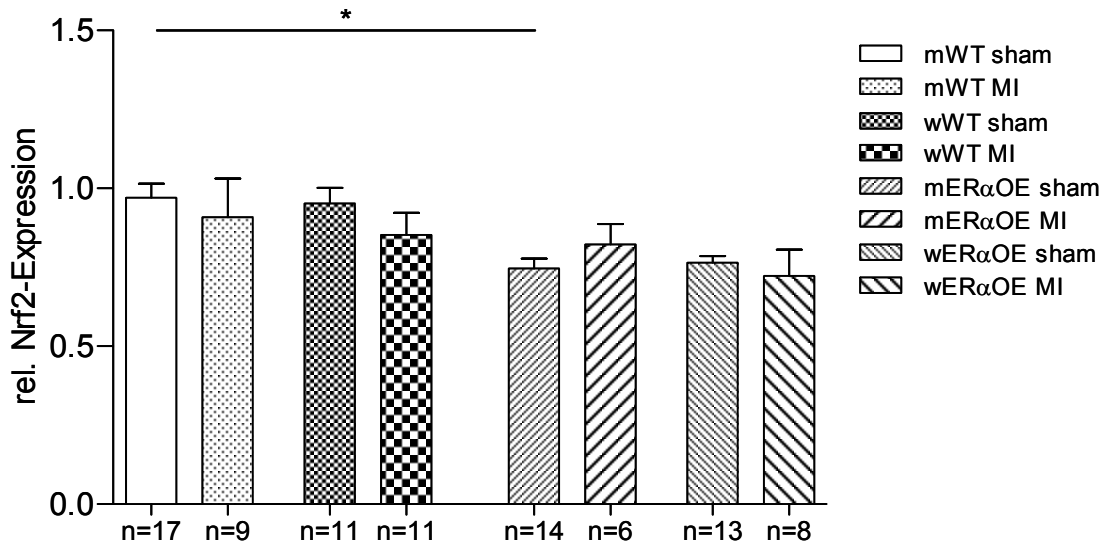
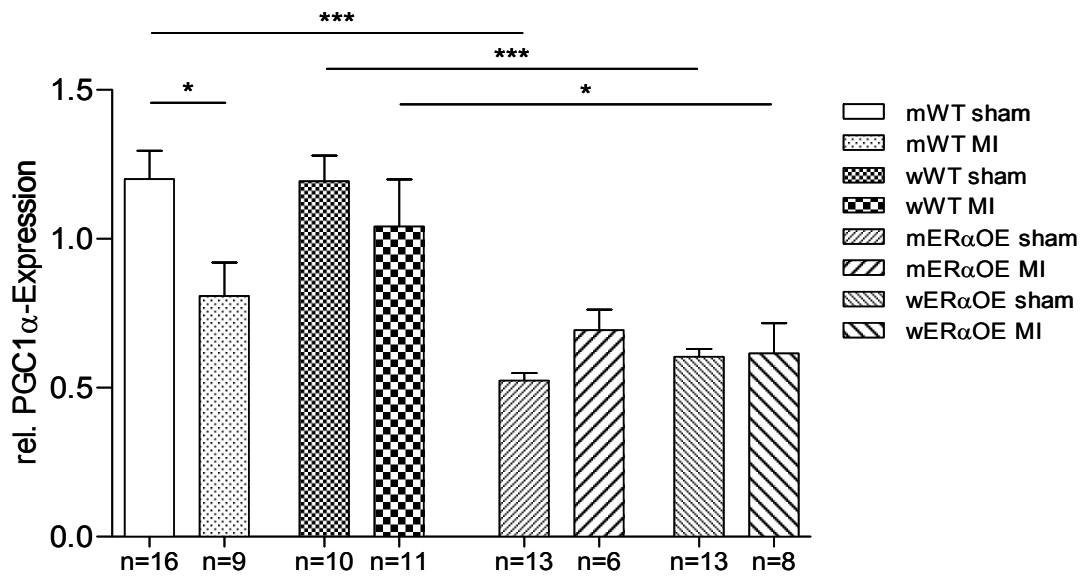


Abbildung 28: Genexpression von Nrf1 (**A**) und Nrf2 (**B**) in Relation zu HPRT in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Auch die Expression von PGC1 α und Mef2a war in ER α OE-Tieren beiderlei Geschlechts im Grundzustand gegenüber den Wildtypen reduziert (Abb. 29A und 29B).

Im Vergleich zu scheinoperierten Tieren konnte bei ER α OE-Tieren nach Infarktinduktion keine Expressionsveränderung beobachtet werden. Dagegen zeigten WT-Weibchen sowohl für PGC1 α als auch für Mef2a eine tendenziell verminderte Expression. Bei männlichen WT-Tieren führte der Infarkt zu einer tendenziell reduzierten Mef2a-Expression und einer signifikant reduzierten PGC1 α -Expression (Abb. 29A und 29B). Insgesamt war die Expression von Mef2a und PGC1 α nach Infarkt in ER α OE-Tieren aber immer noch niedriger als in WT -Tieren (Abb. 29A und 29B).

A



B

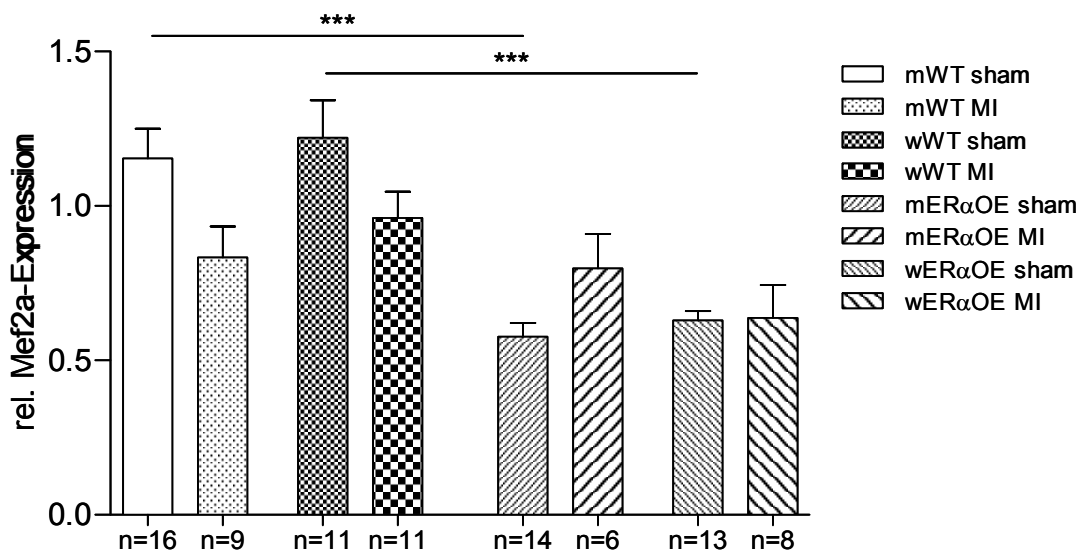


Abbildung 29: Genexpression von PGC1 α (A) und Mef2a (B) in Relation zu HPRT in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Diese Ergebnisse konnten nicht belegen, dass die erhöhte Menge an mtDNA in ER α OE-Tieren auf eine gesteigerte Mitochondrienbiogenese zurückzuführen ist. Vielmehr scheint es so, als ob die ER α -Überexpression die Biogenese von Mitochondrien unterdrückt. Möglicherweise können die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einen Hinweis zur Klärung der Diskrepanz zwischen dem erhöhten mtDNA-Gehalt und der eventuell reduzierten Mitochondrienbiogenese geben.

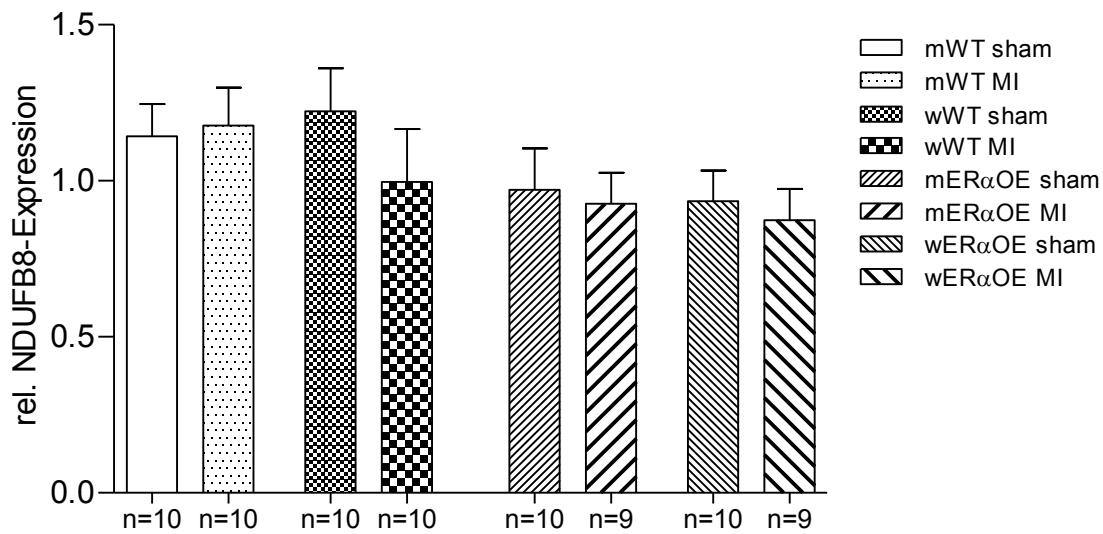
3.7.3 Untersuchung der mitochondrialen Funktion

Zur Untersuchung der mitochondrialen Funktion wurde zunächst die Expression von Untereinheiten aller Komplexe der Atmungskette auf Protein- bzw. mRNA-Ebene in linksventrikulären Proben scheinoperierter und infarzierter Tiere untersucht. Zur genaueren Untersuchung der mitochondrialen Funktion *in situ* wurden Muskelfasern aus linksventrikulären Proben permeabilisiert und ihr Sauerstoffverbrauch bei unterschiedlichen Zuständen der Substratzufuhr gemessen.

3.7.3.1 Untersuchung der Expression der verschiedenen Komplexe der Atmungskette

Die Proteinexpression von NDUFB8 (Untereinheit der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, Komplex I der Atmungskette) und SDHB (Untereinheit B der der Succinat-Dehydrogenase, Komplex II der Atmungskette) war bei ER α OE-Tieren und WT-Tieren nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 30A und 30B). Bei männlichen Mäusen beider Genotypen konnte eine tendenzielle Reduktion der Proteinmenge von SDHB nach Infarktinduktion beobachtet werden (Abb. 30B).

A



B

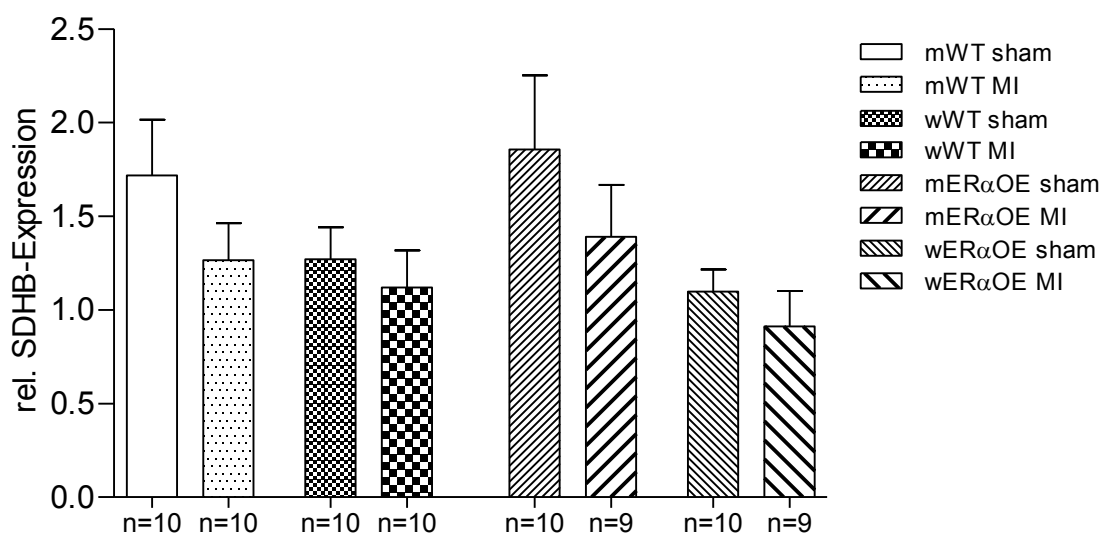
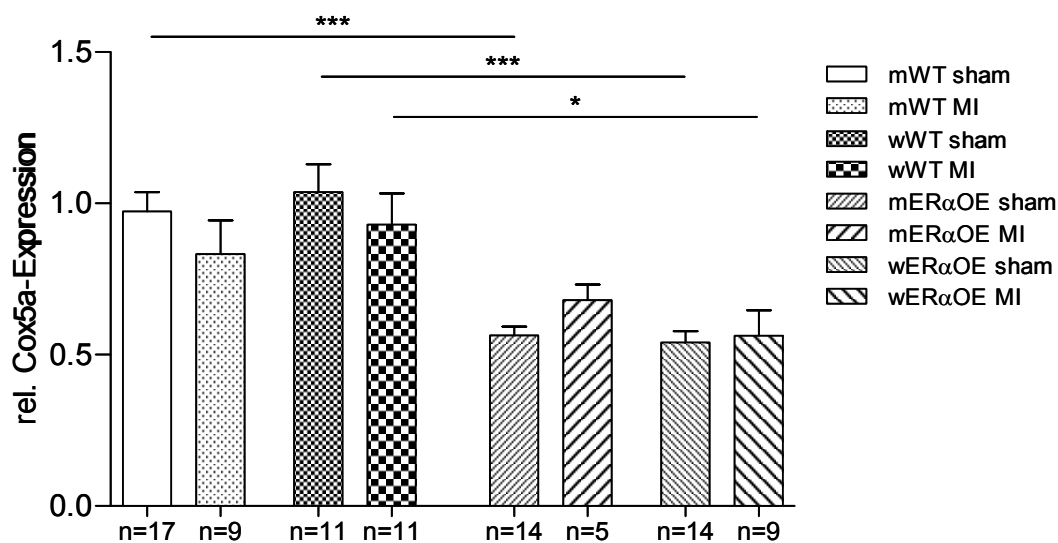


Abbildung 30: Proteinexpression von **(A)** NDUFB8 (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Untereinheit) und **(B)** SDHB (Succinat-Dehydrogenase Komplex, Untereinheit B) in Relation zum aufgetragenen Protein in infarzierten und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation.

Die Analyse der Expression von Untereinheiten des dritten Komplexes der Atmungskette wurde sowohl auf mRNA- als auch Proteinexpressionsebene durchgeführt. Auf mRNA-Ebene konnte unabhängig vom Infarkt eine reduzierte Cox5a-Expression bei ER α OE-Tieren festgestellt werden (Abb. 31A).

Auf Proteinebene zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Untereinheit 2 des Ubichinon-Cytochrom C-Reduktase-Komplexes (UQCRC2) zwischen ER α OE- und WT-Tieren (Abb. 31B).

A



B

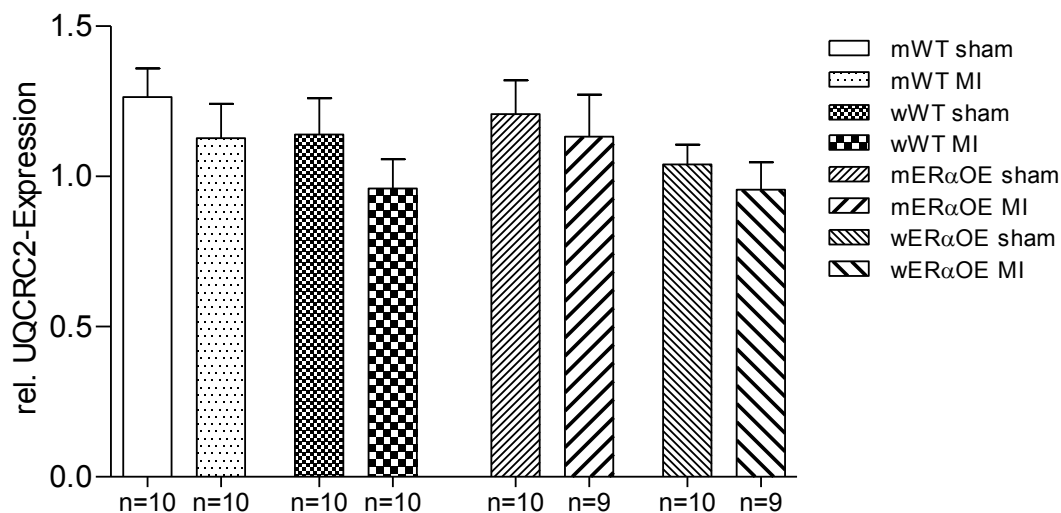


Abbildung 31: (A) Genexpression von Cox5a in Relation zu HPRT und (B) Proteinexpression von UQCRC2 (Ubichinon-Cytochrom C-Reduktase-Komplex, Untereinheit 2) in Relation zur aufgetragenen Proteinmenge. Untersucht wurden infarzierte (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierte Tiere 14 Tage nach Operation. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$.

Auch die Proteinexpression von MTCO1 (Untereinheit 1 der Cytochrom C-Oxidase, Komplex IV der Atmungskette) ist bei ER α OE-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich gegenüber WT-Tieren (Abb. 32).

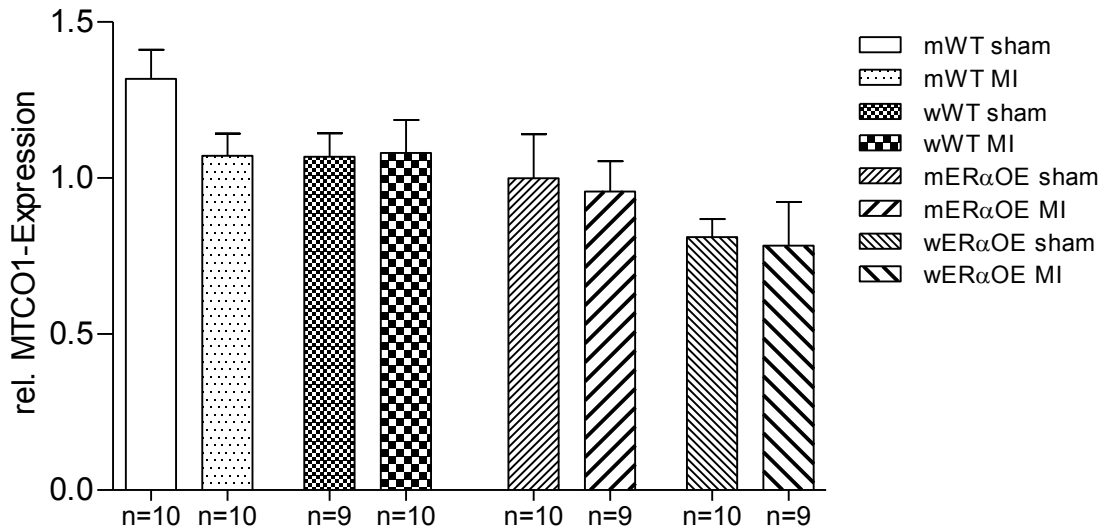


Abbildung 32: Proteinexpression von MTCO1 (Cytochrom C-Oxidase Untereinheit 1) in Relation zum aufgetragenen Protein in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation.

Die Expression verschiedener Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette) wurde wiederum auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die mRNA-Expression von ATP5K war bei scheinoperierten ER α OE-Tieren gegenüber WT-Tieren reduziert (Abb. 33A). Während in ER α OE-Tieren kein Effekt durch die Infarktinduktion erzielt wurde, kam es bei männlichen WT-Tieren zu einer Expressionsverminderung, wodurch genotypspezifische Unterschiede aufgehoben wurden (Abb. 33A). Auf Proteinebene konnten dagegen keine Unterschiede zwischen ER α OE- und WT-Mäusen festgestellt werden (Abb. 33B).

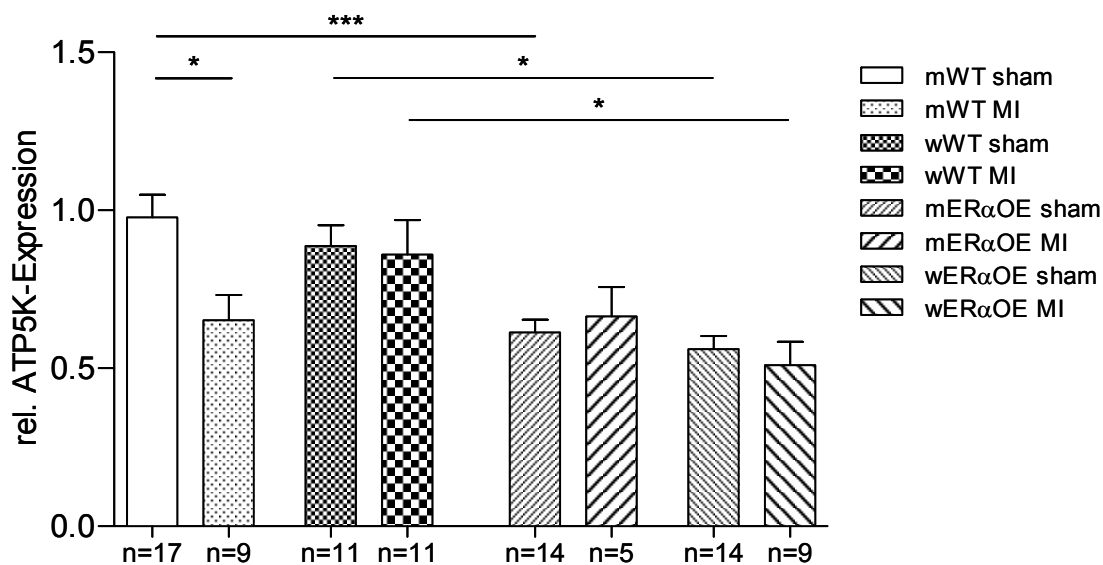
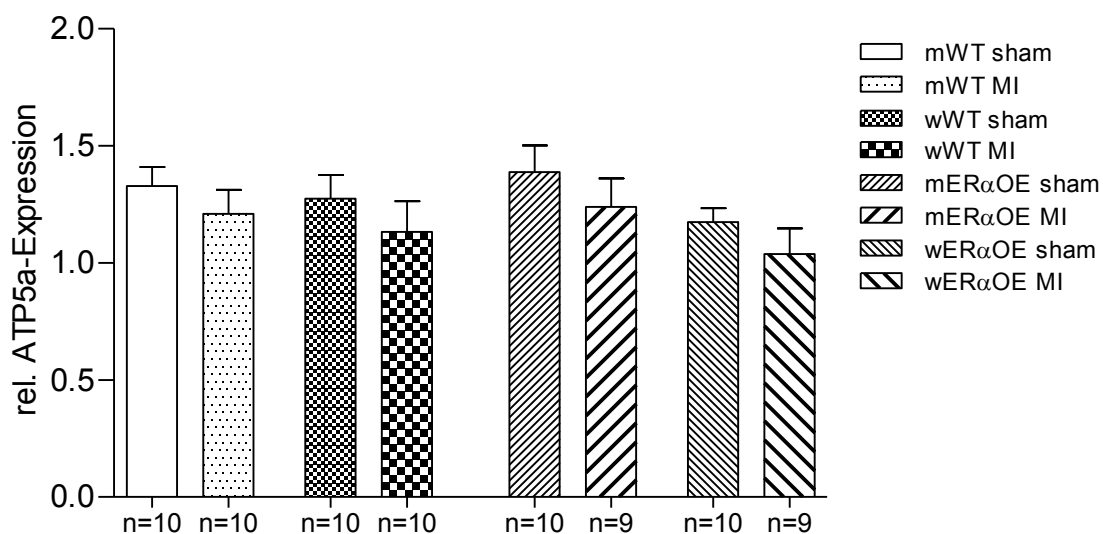
A**B**

Abbildung 33: (A) Genexpression von ATP5K in Relation zu HPRT und **(B)** Proteinexpression von ATP5A (ATP-Synthase, α -Untereinheit 1) relativ zur aufgetragenen Proteinmenge in infarzierten (Infarktgröße >10% des LV) und scheinoperierten Tieren 14 Tage nach Operation * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$.

Zusammenfassend ergab die Analyse der Expression verschiedener Komplexe der Atmungskette, dass die mRNA-Expression bei ER α OE-Tieren verringert ist, auf Proteinebene jedoch keine Unterschiede gegenüber WT-Tieren bestanden. Ob die ER α -Überexpression einen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität hat und inwieweit sich *Remote*-Bereich und Infarktbereich voneinander unterscheiden, sollte im Folgenden untersucht werden.

3.7.3.2 Nach einem Infarkt zeigen ER α OE-Männchen eine höhere Mitochondrienatmung im Remote-Bereich als Wildtyp-Männchen

Um zu überprüfen, ob die ER α -Überexpression einen Einfluss auf Mitochondrienatmung hat, wurden linksventrikuläre Proben aus operierten ER α OE- und WT-Tieren entnommen. Die Gewebeproben wurden schonend in einzelne Muskelfasern zerkleinert und diese Fasern mit Hilfe von Saponin permeabilisiert. Dadurch wurde erreicht, dass der Sauerstoffverbrauch der Gewebeproben in einer sog. Clark-Elektrode bei unterschiedlichen Zuständen der Substratzufuhr gemessen werden konnte, ohne dass die Mitochondrien aus ihrer natürlichen Umgebung innerhalb des Kardiomyozyten herausgerissen werden. Für den Versuch wurden sowohl scheinoperierte als auch infarzierte Tiere eingesetzt. Bei den infarzierten Tieren wurde der *Remote*-Bereich des linken Ventrikels und der Perinfarktbereich getrennt voneinander vermessen.

Im *State 3*, d.h. bei Substratüberschuss und ADP-Sättigung des Puffers wurde die maximale respiratorische Kapazität der verschiedenen Gewebeproben des linken Ventrikels gemessen. Bei scheinoperierten Tieren konnten weder genotyp- noch geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden. Nach Infarktinduktion sank die mitochondriale Atmung im Perinfarktbereich bei allen untersuchten Gruppen auf ein vergleichbar niedriges Niveau. Allerdings wurden im *Remote*-Bereich Unterschiede festgestellt. So konnten Weibchen beiderlei Genotyps und männliche ER α OE-Tiere den Sauerstoffverbrauch im *Remote*-Bereich auf einem Niveau halten, welches annähernd dem der scheinoperierten Tiere entspricht. Wildtyp-Männchen dagegen zeigten auch im *Remote*-Bereich eine reduzierte Mitochondrienatmung (Abb. 34).

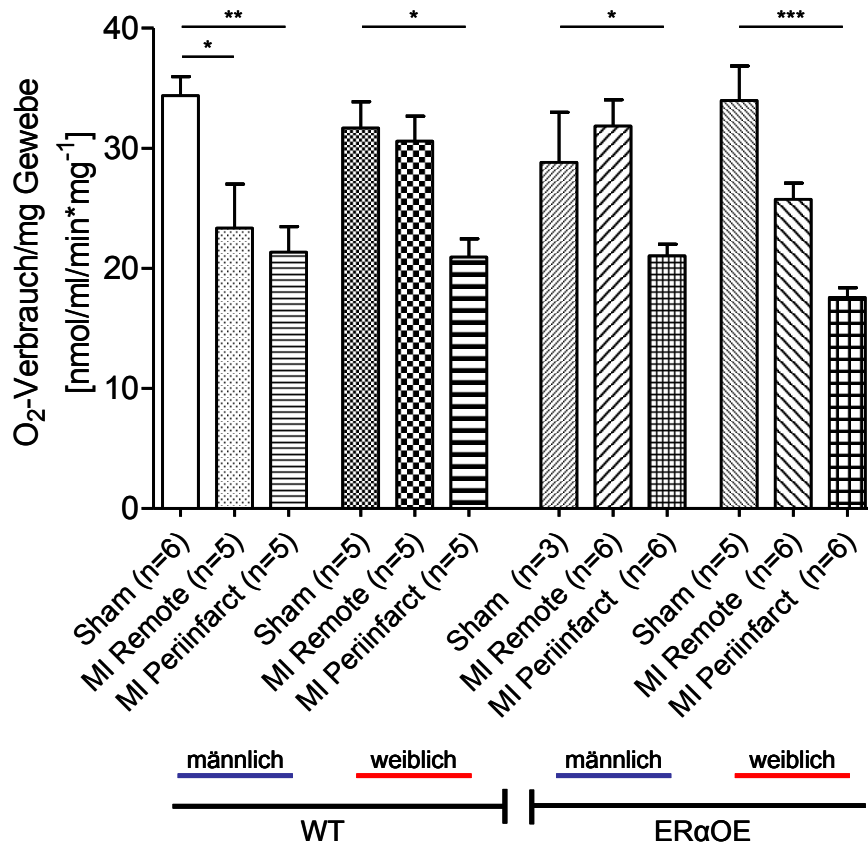


Abbildung 34: Die State3-Respiration aller scheinoperierten sowie der infarzierten Tiere, bei denen der Remote- und Periinfarktbereich getrennt voneinander gemessen wurden. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Im *State 4*, d.h. bei Substrat- und ADP-Mangel wird die Atmungsaktivität gemessen, die unabhängig von der oxidativen Phosphorylierung, d.h. zum Beispiel durch die entkoppelte Atmung stattfindet. Die Untersuchung der *State 4*-Atmung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 35).

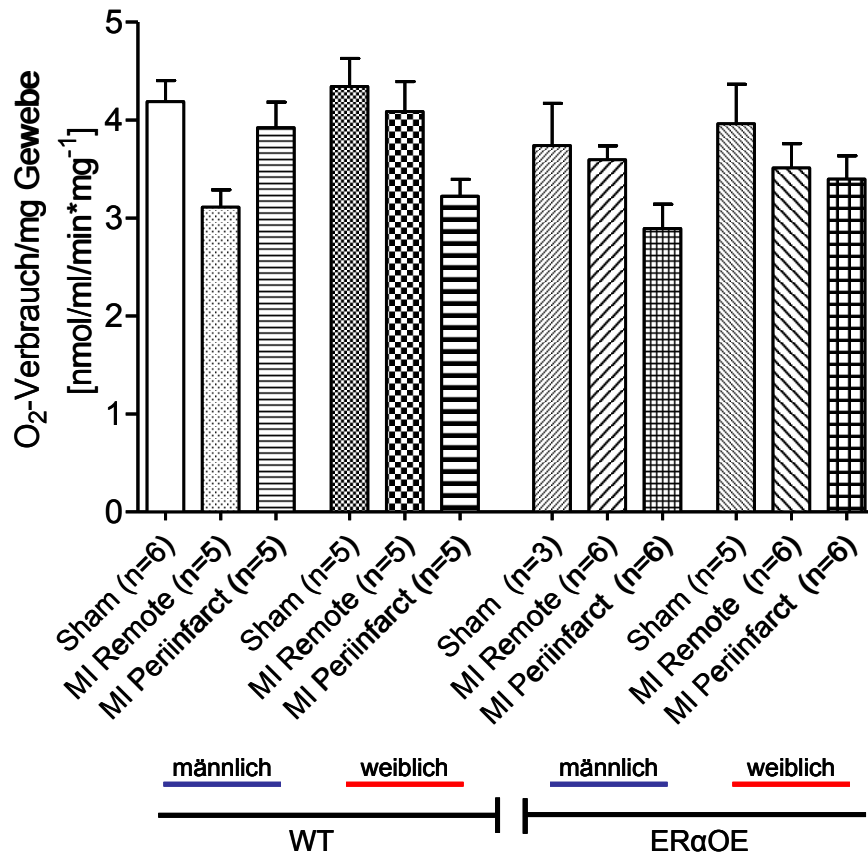


Abbildung 35: Die State4-Respiration aller scheinoperierten Tiere sowie der infarzierten Tiere, bei denen der Remote- und der Periinfarktbereich getrennt voneinander gemessen wurden.

Als Kontrolle der korrekten Faserung der jeweiligen Gewebeproben dient der sog. *respiratory control index* (RCI). Hierbei wird die gemessene Atmungsaktivität im *State 3* in Relation zu der im *State 4* gesetzt. Laut Literatur (Kuznetsov et al., 2008) sollte dabei im gesunden linksventrikulären Gewebe ein Wert von 6-10 erreicht werden. Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, lag dieser Wert bei allen scheinoperierten Tieren im Normbereich. Im Remote-Bereich und im Periinfarktbereich infarzierter Tiere waren die Werte wie erwartet niedriger.

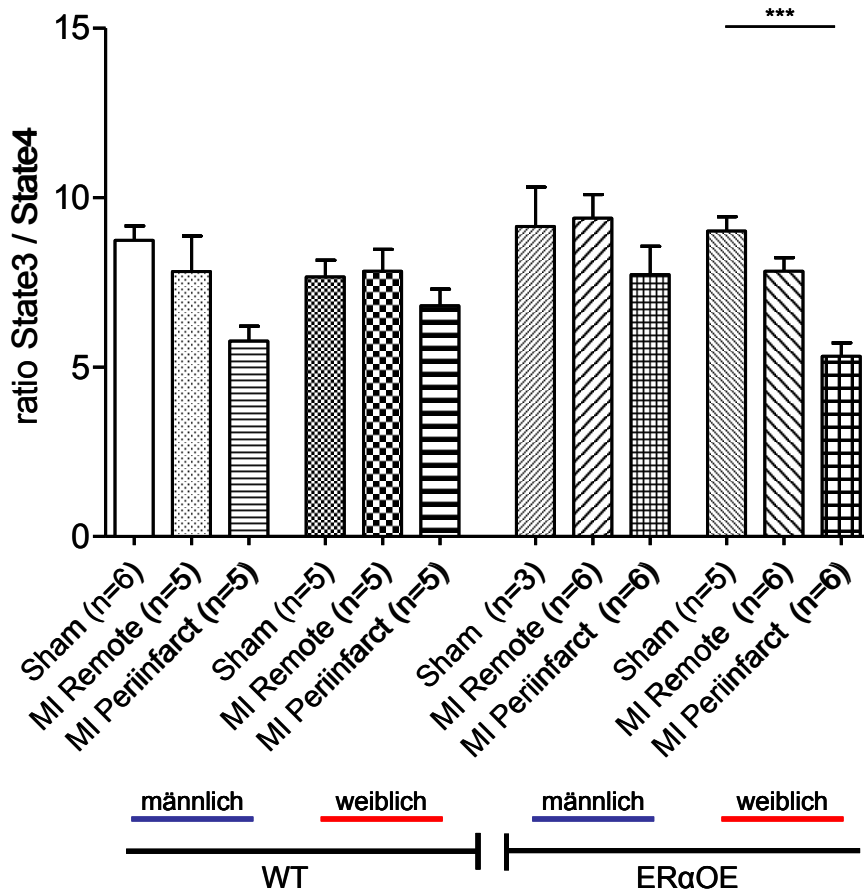


Abbildung 36: RCI-Werte aller untersuchten Gruppen, ermittelt anhand des Verhältnisses zwischen *State 3*- und *State 4*-Respiration. *** = $p < 0,001$.

Aus den Ergebnissen der Messung der respiratorischen Aktivität der linksventrikulären Proben operierter Tiere und den Ergebnissen der Expression der verschiedenen Komplexe der Atmungskette in ERαOE- und WT-Tiere kann der Schluss gezogen werden, dass die mitochondriale Atmung von ERαOE-Tieren gegenüber Wildtypen weitestgehend unverändert bleibt. Die Daten legen allerdings die Vermutung nahe, dass der ERα bei männlichen Mäusen zur Protektion der Mitochondrien im *Remote*-Bereich beiträgt.

3.7.3.3 Infarzierte männliche ERαOE-Mäuse neigen zur perinukleären Akkumulation von Mitochondrien in Kardiomyozyten des Periinfarktbereichs

Um zu dokumentieren, ob die Überexpression des ERα im Allgemeinen einen Einfluss auf die Struktur des Myokards und im Speziellen auf den Zustand nach einem Infarkt hat, wurden den operierten Tieren Biopsien für elektronenmikroskopische Aufnahmen entnommen. Es sollte analysiert werden, ob die Mitochondrienstruktur und die Lokalisation der Mitochondrien innerhalb des Kardiomyozyten durch die Infarktinduktion verändert werden und ob die gesteigerte ERα-Expression hierbei möglicherweise einen modulierenden

Effekt hat. Untersucht wurden sowohl scheinoperierte als auch infarzierte Wildtyp- und ER α OE-Tiere beiderlei Geschlechts.

In scheinoperierten Tieren konnte ein gleichmäßiges Muster von schnurartig aneinandergereihten Mitochondrien zwischen den Myofibrillen beobachtet werden. Wildtyp- und ER α OE-Tiere beiderlei Geschlechts zeigten hierbei keine Unterschiede (Abb. 37).

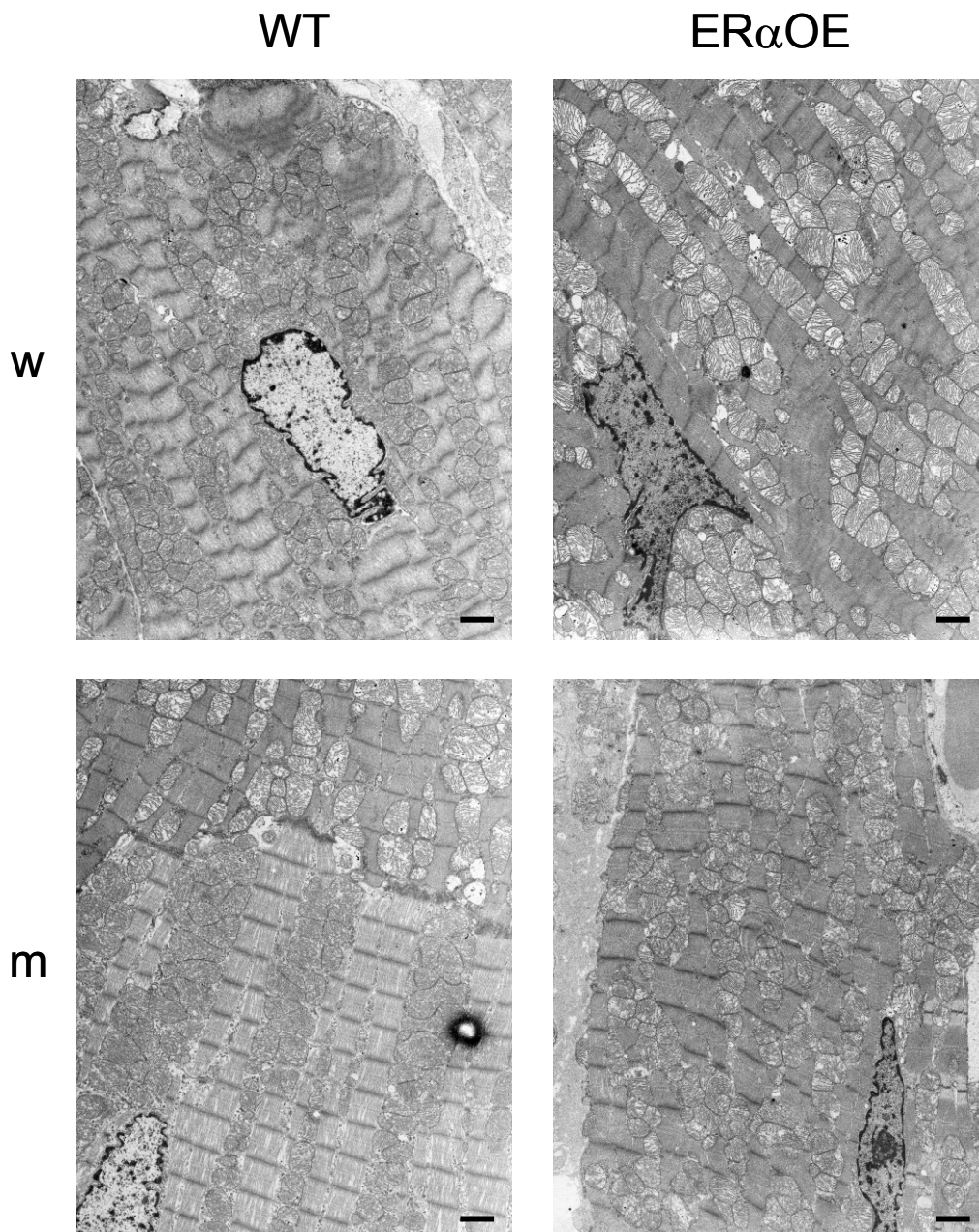


Abbildung 37: Repräsentative Elektronenmikroskopische Aufnahmen von linksventrikulären Kardiomyozyten in scheinoperierten Mäusen. Zu sehen sind kleine runde Mitochondrien, die meist aneinandergereiht zwischen Myofibrillen liegen, welche sich entlang der Längsachse des Kardiomyozyten erstrecken. Außerdem ist jeweils der große Zellkern sichtbar. (Vergrößerung x4646, Skalierungsbalken 1 μ m)

Nach MI konnte im *Remote*-Bereich bei allen untersuchten Tieren keine Veränderung der Mitochondrienstruktur und -anzahl beobachtet werden. Bei weiblichen Tieren beiderlei Genotyps waren im Perinfarktbereich wenige Mitochondrien mit beschädigten Cristae zu erkennen (Abb. 38 oben).

Bei männlichen WT-Tieren wiesen die Mitochondrien des Perinfarktbereichs eine unregelmäßige Struktur auf und die Cristae der Mitochondrien waren teilweise zerstört. Im Gegensatz dazu waren die Mitochondrien des Perinfarktbereichs bei ER α OE-Männchen meist intakt und es war in vielen Kardiomyozyten eine massive Akkumulation von Mitochondrien um den Zellkern zu beobachten (Abb. 38 unten).

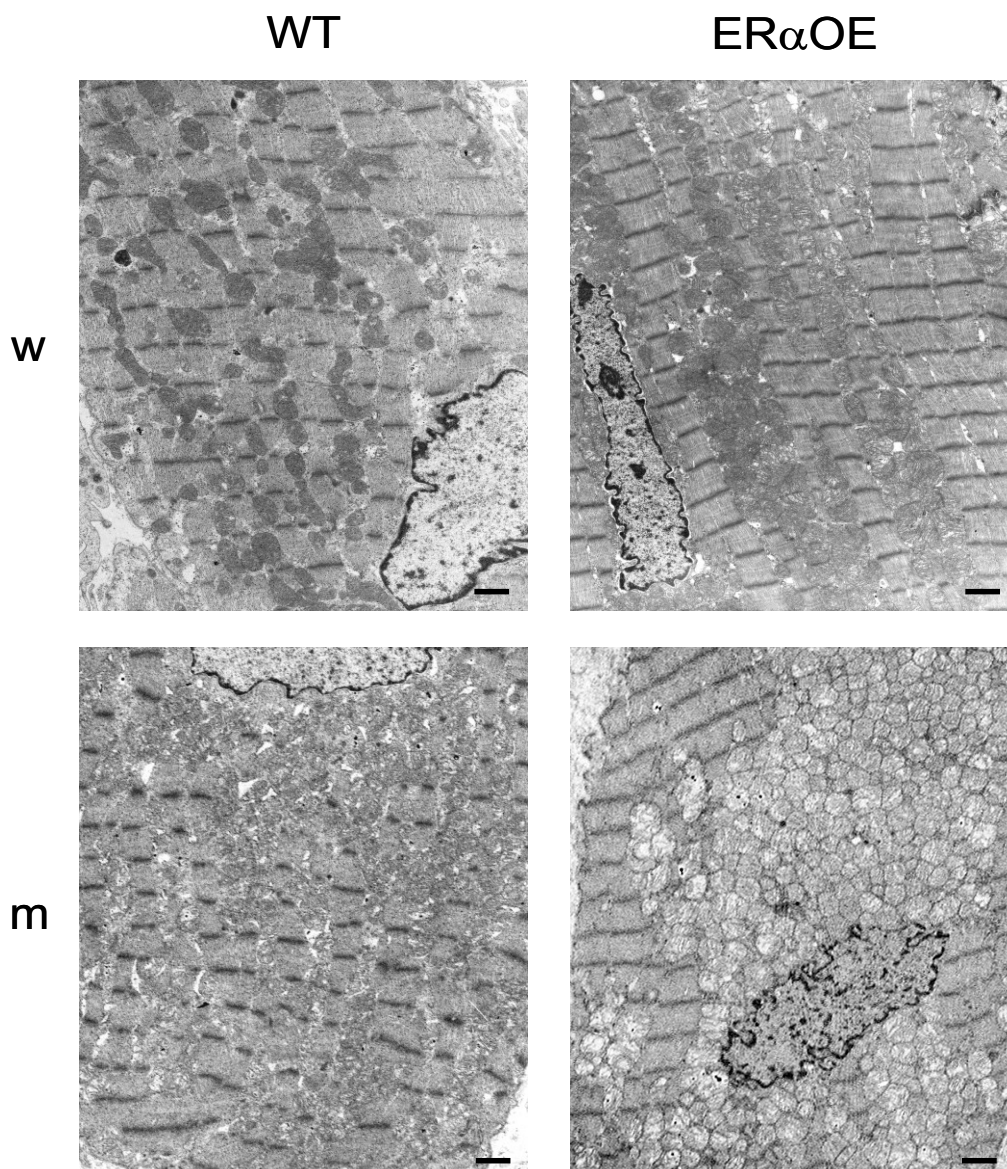


Abbildung 38: Mitochondrien in Kardiomyozyten des Perinfarktbereichs sammeln sich bei männlichen infarzierten ER α OE-Mäusen um den Zellkern. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von linksventrikulären Kardiomyozyten des Perinfarktbereichs in infarzierten Mäusen. (Vergrößerung x4646, Skalierungsbalken 1 μ m)

4 Diskussion

Viele Menschen sterben jedes Jahr infolge eines Herzinfarkts und seinen Folgen. Beim Verschluss einer Koronararterie durch arteriosklerotische Veränderungen kommt es zum sofortigen Verlust der Kontraktilität des ischämischen Gewebes und bei längerem Anhalten der Ischämie zur Apoptose bzw. Nekrose der unterversorgten Herzmuskelzellen (Anversa et al., 1998, Langer et al., 1987). Da der Herzinfarkt eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern darstellt, wird seit langem intensiv untersucht, welche Ursachen sein Entstehen begünstigen und welche Therapien den Patienten am besten helfen.

Wie bei anderen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems treten auch beim Herzinfarkt Geschlechterunterschiede auf (Regitz-Zagrosek et al., 2007, Lawton, 2011, Ostadal et al., 2009, Regitz-Zagrosek et al., 2006, Wake and Yoshiyama, 2009, Meyer et al., 2006). Epidemiologische Daten belegen, dass Männer im Vergleich mit gleichaltrigen, prämenopausalen Frauen ein höheres Risiko aufweisen, einen Herzinfarkt zu erleiden. Nach Erreichen der Menopause steigt jedoch auch bei Frauen das Risiko, einen Herzinfarkt zu erleiden. Daher wurde postuliert, dass das weibliche Geschlechtshormon Östrogen (17 β -Estradiol, E2) bzw. die Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) vor einem Herzinfarkt schützen können.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit der ER α den Verlauf eines Myokardinfarkts im murinen Modell beeinflussen kann. Bisherige Untersuchungen in diesem Kontext nutzten dazu entweder die Gabe eines Rezeptoragonisten oder die genetische Deletion des Rezeptors. Beide Systeme haben den Nachteil, dass sie den ganzen Organismus und nicht nur das Herz betreffen. Hier wurde mit der Kardiomyozyten-spezifischen Überexpression des ER α ein neuer Versuchsansatz gewählt. Mit Hilfe dieses bisher einzigartigen Versuchsmodells der ER α -Überexpression (ER α OE) konnte sichergestellt werden, dass die erzielten Resultate nur durch die gesteigerte Aktivität des ER α im Herzen bedingt sind.

Obwohl das primäre Ziel der Arbeit die Analyse des Überlebens und der Herzfunktion nach Infarkt war, wurde auch untersucht, wie sich die Überexpression des ER α vor Induktion des Infarkts auswirkt. Daher wurden auch scheinoperierte Tiere eingesetzt, um den Effekt der ER α -Überexpression im Grundzustand zu untersuchen.

4.1 Effekt der ER α -Überexpression im Grundzustand

In ER α OE-Mäusen war die Proteinmenge des ER α im Herzen um das 10-12fache gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöht. Anhand des Vergleichs der Proteinexpression in verschiedenen Organen wurde bestätigt, dass die ER α -Überexpression tatsächlich nur auf das Herz beschränkt ist.

In der bisher einzigen Publikation, die den Effekt einer systemischen ER α -Überexpression in der Maus beschrieb, wurde der Einfluss der ER α -Überexpression auf die Fertilität untersucht (Tomic et al., 2007). Obwohl die Expression des ER α im Uterus auf mRNA-Ebene nur um den Faktor 2,3 gegenüber Wildtypen erhöht war, konnten signifikante Veränderungen beobachtet werden. Vergleichsweise ist die ER α -Expression in unserem Versuchsmodell wesentlich höher und somit sind signifikante Unterschiede zwischen ER α OE- und WT-Mäusen zu erwarten.

Wir konnten mittels immunhistologischer Färbungen zeigen, dass die intrazelluläre Lokalisation des ER α in ER α OE-Mäusen mit der in Wildtyp-Mäusen vergleichbar ist. Allerdings war bei ER α OE-Mäusen eine intensivere nukleäre ER α -Färbung zu beobachten. Zusammen mit der signifikant erhöhten Ser¹¹⁸-Phosphorylierung des ER α , welche essentiell für die transkriptionelle Aktivierung des ER α ist, deutet dies darauf hin, dass die Wirkung des ER α als Transkriptionsfaktor bei ER α OE-Mäusen gegenüber Wildtypen verstärkt ist. Studien zur Funktion des ER α als Transkriptionsfaktor in MCF7-Zellen, einer humanen Brustkrebs-Zelllinie, belegen, dass er einen modulierenden Effekt auf die Expression einer sehr großen Anzahl von Genen hat (Carroll et al., 2006, Welboren et al., 2009). So konnten Welboren und Kollegen und in mit E2 behandelten MCF7-Zellen 596 Gene identifizieren, deren Expression durch den ER α je nach Dauer der Behandlung mit E2 (1-8h) unterschiedlich reguliert wird. Unter anderen waren hierbei Gene, die mit Zellproliferation und Zellwachstum im Zusammenhang stehen wesentlich erhöht (Welboren et al., 2009).

4.1.1 Die ER α -Überexpression führt zur Herzhypertrophie

ER α OE-Tiere wiesen ein gegenüber WT-Tieren erhöhtes Herzgewicht auf. Diese Herzhypertrophie ging mit signifikant größeren systolischen und diastolischen Volumina des linken Ventrikels einher, die Dicke der Herzwand blieb aber gegenüber Wildtypen unverändert. Übereinstimmend mit diesem Befund ergab die Untersuchung isolierter Kardiomyozyten, dass die Massezunahme des Herzens bei ER α OE-Mäusen auf ein Längen- nicht aber Breitenwachstum der einzelnen Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Wir konnten eine gesteigerte Expression der Hypertrophiemarker NPPA und NPPB nachweisen. Zudem war die Expression von α MHC verringert und gleichzeitig die Expression von β MHC gesteigert. Diese Befunde stehen im Einklang mit Befunden unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass eine E2-induzierte Aktivierung des ER α zu einer verstärkten Expression der Hypertrophie-assoziierten Gene NPPA und *α -Actinin 2 (ACTN2)* in AC16-Zellen, einer humanen Kardiomyozyten-ähnlichen Zelllinie, führte (Mahmoodzadeh et al., 2012). Dennoch stellt sich die Frage, ob die Herzhypertrophie der ER α OE-Mäuse positiv oder negativ zu werten ist:

Die Herzhypertrophie, d. h. das Kardiomyozytenwachstum infolge einer gesteigerten Arbeitslast des Herzens, kann entweder durch physiologische Stimuli (post-natales Wachstum, Ausdauersport, Schwangerschaft) oder durch pathologische Stimuli (Bluthochdruck, Herzklappeninsuffizienz, etc.) ausgelöst werden. Dementsprechend etablierten sich die Begriffe der physiologischen bzw. pathologischen Hypertrophie. Je nachdem, ob die Hypertrophie durch erhöhtes Blutvolumen oder gesteigerten Blutdruck ausgelöst wird, kommt es zu einem ekzentrischen Wachstum (Zunahme des Kammervolumens bei gleichzeitig proportionalem Wachstum der Wanddicke) oder konzentrischen Wachstum des Herzens (Zunahme der Wanddicke bei nahezu unverändertem Kammervolumen) (Dorn et al., 2003, Hunter and Chien, 1999, Kehat and Molkentin, 2010). Bleiben pathologische Stimuli über einen längeren Zeitraum erhalten, kommt es zu maladapтивem Gewebeumbau, d.h. der Apoptose und/oder Nekrose von Kardiomyozyten und der Proliferation kardialer Fibroblasten. Hierdurch wird eine exzessive Kollagenablagerung (Fibrose) gefördert und die mechanische Flexibilität des Herzmuskels zunehmend eingeschränkt. Infolgedessen kann die Herzfunktion bis hin zur Herzinsuffizienz abnehmen (Brower et al., 2006, Gradman and Alfayoumi, 2006).

Auf molekularer Ebene ist die Herzhypertrophie meist mit der Aktivierung eines „hypertrophen Genprogramms“ verbunden. Typisch hierfür ist die verringerte Expression von α MHC bei gleichzeitig gesteigerter Expression von NPPA, NPPB und fötaler Isoformen kontraktile Proteine wie z.B. α -smooth muscle actin (α SMA) oder β MHC (Dorn et al., 2003, Komuro and Yazaki, 1993, van den Bosch et al., 2006). Ein Hinweis auf physiologische Hypertrophie ist die Aktivierung des IGF1/PI3K/Akt-Signaltransduktionswegs. Hierdurch wird die ribosomale Aktivität gesteigert und somit die Effizienz der Proteintranslation erhöht (Kemi et al., 2008, McMullen et al., 2003). Demgegenüber kann die verringerte Expression der *sarkoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA2a) unter pathologischen Bedingungen auftreten (Bernardo et al., 2010). Zudem fördert die pathologische Hypertrophie ein Übergehen von einem oxidativen zu einem eher glykolytischen Metabolismus, vergleichbar mit dem im fötalen Stadium (Frey and Olson, 2003). Daher wird die Reduktion der Expression von Genen, die mit der Fettsäureoxidation im Zusammenhang stehen, als Anzeichen für eine pathologische Hypertrophie gewertet (Beisvag et al., 2009, Bernardo et al., 2010).

Ob durch die ER α -Überexpression eine physiologische oder pathologische Form der Hypertrophie induziert wird kann nicht eindeutig festgestellt werden. Vielmehr zeigen sie Merkmale beider Hypertrophieformen:

Es ist anzunehmen, dass der ER α entweder direkt als Transkriptionsfaktor fungiert oder mit anderen Wachstumsfaktoren über das nicht-genomische *Signaling* wechselwirkt, um das Zellwachstum anzuregen. So ist z. B. beschrieben, dass der ER α mit verschiedenen

Wachstumsfaktoren wie u. a. *transforming growth factor β* (TGF β) (Band and Laiho, 2011), *insulin-like growth factor* (IGF) (Kahlert et al., 2000, Lee et al., 1999) und *epidermal growth factor* (EGF) (Razandi et al., 2003, Ignar-Trowbridge et al., 1992) wechselwirkt und dadurch das Zellwachstum beeinflussen kann. Wir nehmen an, dass das Zusammenspiel von ER α und Wachstumsfaktoren bei ER α OE-Mäusen zum beobachteten Wachstum der Kardiomyozyten und einer ekzentrischen Form der Hypertrophie führt, wie sie auch bei Ausdauersportlern oder Schwangeren anzutreffen ist (Dorn, 2007, Eghbali et al., 2005). Infolge des bei ER α OE-Mäusen gesteigerten linksventrikulären Volumens wirkt auf die Herzwände eine erhöhte Volumenlast. Da ihre Kardiomyozyten aber kein adäquates Breitenwachstum aufweisen, um dieser Kraft entgegenzuwirken, kommt es, wie bei künstlich „gestreckten“ Kardiomyozyten (Kudoh et al., 2003, van Wamel et al., 2000), zur kompensatorischen Steigerung der Expression von NPPA und NPPB, was zur Vasodilatation, gesteigerten Diurese und Hemmung des Wachstums führt. Die erhöhte Expression von NPPA und NPPB sowie die erhöhte Expression von β MHC anstelle der „normalen“ α MHC-Isoform können als pathologisches Signal gewertet werden (Dorn et al., 1994, Morkin, 2000, Swynghedauw, 1999, Baxter, 2004), allerdings sind dies auch für Schwangere und Ausdauersportler typische Merkmale (Dorn, 2007, Eghbali et al., 2005, Zhang et al., 1995). Interessanterweise scheint der ER α selbst ein entscheidender Faktor für diesen kompensatorischen Mechanismus zu sein. Zumindest für NPPA ist bekannt, dass die Expression durch den ER α induziert wird (Jankowski et al., 2001, Mahmoodzadeh et al., 2012). Somit wäre der ER α zwar für die Induktion der Hypertrophie in ER α OE-Mäusen verantwortlich, aber gleichzeitig würde er das Ausmaß der Hypertrophie begrenzen.

Wesentlich für eine physiologische Hypertrophie in ER α OE-Mäusen spricht, dass sie keine Fibrose aufweisen. Dies konnte sowohl anhand der Genexpressionsdaten von Col1, Col3 und MMP2 sowie anhand der Kollagenfärbung in Gewebeschnitten (Doktorarbeit X. Zhang) nachgewiesen werden. Somit scheint es bei ER α OE-Mäusen weder zur Kardiomyozyten-Apoptose und –Nekrose noch zur nachfolgenden Expansion von Fibroblasten zu kommen.

Neben diesen für eine physiologische Hypertrophie sprechenden Befunden zeigen ER α OE-Mäuse allerdings auch Indizien einer pathologischen Hypertrophie. So deutet die verminderte Expression der Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums (sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase [Serca2a] bzw. Ryanodinrezeptor [Ryr2]) der ER α OE-Mäusen auf ein verändertes intrazelluläres Ca²⁺-Signaling hin, was zu Arrhythmien führen könnte. Ebenso ist die verminderte Expression von Mef2a und PGC1 α ein Anzeichen eines verminderten Fettsäurestoffwechsels und einer verstärkten Nutzung der Glykolyse zur Energiegewinnung. Mit der dadurch bedingten geringeren Menge an zur Verfügung stehendem ATP könnte die verstärkte Expression von β MHC anstelle von α MHC erklärt werden (Dorn et al., 1994, Swynghedauw, 1999).

4.1.2 Die ER α -Überexpression führt zur verminderten Kontraktilität des Herzens im Grundzustand

Die funktionelle Untersuchung der Herzleistung wurde mit Hilfe der Echokardiographie durchgeführt. Als nicht-invasive Methode eignet sich die Echokardiographie sehr gut, die funktionelle Adaption des linken Ventrikels an die morphologischen Veränderungen nach einem Myokardinfarkt darzustellen. Zur Bestimmung der Herzleistung wurde u. a. die sog. linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) herangezogen. Sie beschreibt den Anteil des vom Herzen bei der Kontraktion ausgeworfenen Blutes (Schlagvolumen) im Verhältnis zum Gesamtblutvolumen des LV und bietet damit die Möglichkeit, die Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels zu messen. Da die Tiere für die Untersuchungen mittels Isofluran-Inhalation in eine leichte Narkose gelegt wurden, sank die Herzfrequenz von Normalwerten um 500-600 auf etwa 450-500 Schläge pro Minute. Die Verringerung der Herzfrequenz führt auch zu einer Reduzierung der gemessenen Ejektionsfraktion. Dennoch eignet sie sich als Funktionsparameter und wurde mehrfach publiziert (Cavasin et al., 2004, Cavasin et al., 2006, Wang et al., 2007, van Rooij et al., 2004, Bansal et al., 2010, Zhang et al., 2012), wobei für gesunde Mäuse Werte zwischen 60-80% angegeben werden. Ein anderer Parameter zur Bestimmung der Herzfunktion ist das sog. Herzzeitvolumen oder *left ventricular cardiac output* (LVCO). Er beschreibt das pro Minute vom Herzen in den Körper gepumpte Blutvolumen. Der Wert des LVCO ist wesentlich abhängig von der physischen Aktivität des untersuchten Subjekts. Beispielsweise beträgt das LVCO bei Ausdauersportlern im Ruhezustand bei 5-6 Litern/min und kann bei maximaler Belastung auf bis zu 40 Litern/min ansteigen (Stout, 2008). Scheinoperierte ER α OE-Mäuse zeigten gegenüber WT-Mäusen eine verminderte Ejektionsfraktion (mWT: 62% bzw. wWT: 66%; mER α OE: 52% bzw. wER α OE: 49%), aber das LVCO war nicht unterschiedlich (mWT: 16,2 ml/min; mER α OE: 15,3 ml/min; wWT: 13,1 ml/min; wER α OE: 13,5 ml/min). Der Befund der verringerten EF bei ER α OE-Mäusen könnte auf eine pathologische Veränderung des Herzens hindeuten. Dagegen lässt das mit WT-Mäusen vergleichbare LVCO den Schluss zu, dass die Herzleistung der ER α OE-Mäuse normal ist. Diese Diskrepanz ist auf die ekzentrische Hypertrophie der ER α OE-Mäuse zurückzuführen. Die bei den ER α OE-Mäusen vorgefundene Massezunahme des Herzens ist durch das Längenwachstum der Kardiomyozyten bedingt. Dieses Wachstum der Kardiomyozyten führt bei ER α OE-Mäusen zur Vergrößerung des Herzkammervolumens. So weisen ER α OE-Mäuse im Vergleich mit WT-Mäusen ein ungefähr 1,5fach größeres diastolisches bzw. systolisches Herzvolumen auf. Daraus folgt, dass das Schlagvolumen (bzw. das LVCO) mit dem der WT-Mäuse vergleichbar ist. Da allerdings die Ejektionsfraktion das Schlagvolumen in Relation zum diastolischen Volumen beschreibt, weisen ER α OE-Tiere eine niedrigere EF als WT-Mäuse auf. Bei Ausdauersportlern, deren Herz infolge physiologischen Wachstums vergrößert ist, kann ebenfalls ein erhöhtes diastolisches Herzvolumen gemessen werden. Meist wird

beschrieben, dass diese Sportler eine mit untrainierten Personen vergleichbare EF aufweisen (Caselli et al., 2011, Fagard, 2003, Pluim et al., 2000, Scharhag et al., 2002). Durch das höhere Herzvolumen bei gleichzeitig „normaler“ EF können Ausdauersportler das LVCO bei Belastung gegenüber untrainierten Personen wesentlich erhöhen. ER α OE-Mäuse ziehen keinen Vorteil aus dem erhöhten Herzvolumen, da die Ejektionsfraktion bzw. die Kontraktilität des Herzmuskels bei ihnen eingeschränkt ist. Allerdings konnten wir keine fibrotischen Veränderungen des Herzmuskels beobachten, welche zur mechanischen Versteifung des Gewebes führen würden. Daher ist eher nicht von einem pathologischen Prozess wie bei einer dilatativen Kardiomyopathie auszugehen.

4.2 Effekt der ER α -Überexpression auf das Überleben und die Herzfunktion nach Myokardinfarkt

In Tiermodellen wird die myokardiale Ischämie durch den Verschluss der Koronararterie des linken Ventrikels induziert. Durch den permanenten Verschluss des Blutgefäßes werden eine irreversible Schädigung und ein Funktionsverlust des Herzens hervorgerufen. Bisherige Studien zu Geschlechterunterschieden nach MI zeigten, dass weibliche Tiere besser als männliche überleben (Cavasin et al., 2004, Gao et al., 2005, Chen et al., 2010). Auch Humanstudien belegen, dass Frauen bis zum Einsetzen der Menopause seltener als Männer von kardiovaskulären Erkrankungen einschließlich des Herzinfarkts betroffen sind (Jeanes et al., 2007, Meyer et al., 2006, Vitale et al., 2009).

4.2.1 Bei weiblichen Tieren wirkt die ER α -Überexpression nach der akuten Phase des MI protektiv

Wie in obigen Studien konnte auch in dieser Doktorarbeit für Wildtyp-Tiere gezeigt werden, dass weibliche Tiere tendenziell besser als männliche überlebten (wWT 60%, mWT 46,7%). Bei ER α OE-Tieren allerdings waren keine Geschlechterunterschiede zu beobachten (wER α OE 44,8%, mER α OE 44,0%). Die meisten Todesfälle fanden während der ersten Stunden nach Induktion des MI statt. Innerhalb dieser akuten Phase nach MI starben bei Wildtyp-Tieren 46,7% (mWT) bzw. 32,0% (wWT) und bei ER α OE-Tieren 36% (mER α OE) bzw. 55,2% (wER α OE). Bei den Operationen wurde darauf geachtet, dass nach dem Verschließen des Brustkorbs keine Luft im Brustraum verblieb, so dass die Tiere nicht infolge eines Pneumothorax verstarben. Ebenfalls wurde die Beatmung nach Beendigung der Operation solange fortgesetzt, bis die Tiere erkennbar von der Narkose erwacht waren und die eigenständige Atmung wiedereinsetzte. Da die intra-operative bzw. akute post-operative Mortalität bei Eingriffen wie MI-Induktion oder Aortenstenose nur selten publiziert wird, kann hier kein verlässlicher Vergleich angestellt werden. In den seltenen Fällen wurden für den Zeitraum kurz nach Operation Mortalitätsraten von 10% bis 33% angegeben (Gao et al., 2005, Skavdahl et al., 2005, Degabriele et al., 2004). Verschiedene Studien, die Ursachen

des schnellen Herztods nach einem Myokardinfarkt untersucht haben, legen die Vermutung nahe, dass diese Tiere infolge einer kardialen Arrhythmie gestorben sind (Roger et al., 2012, Solomon et al., 2005). Zur Bestätigung dieser Annahme könnte die intra-operative EKG-Messung dienen, die jedoch im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht zur Verfügung stand.

Auffällig ist der Verlauf der Überlebenskurve bei weiblichen ER α OE-Mäusen. Sie zeigten die höchste akute Mortalität, aber nach der akuten Phase überlebten sie vollständig. Faktoren, die ausschließlich bei ER α OE-Weibchen aufgetreten wären und eine Prädisposition für kardiale Arrhythmien darstellen, konnten bei unseren Untersuchungen jedoch nicht gefunden werden. ER α OE-Tiere beiderlei Geschlechts wiesen ein signifikant erhöhtes Herzgewicht sowie eine niedrige EF als WT-Tiere auf. Beide Symptome steigern die Wahrscheinlichkeit eines schnellen Herztods (Reinier et al., 2011). Nach Induktion eines Myokardinfarkts kommt es auf molekularer Ebene zur Dysregulation der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase im Herzen, wodurch tödliche Arrhythmien ausgelöst werden können (Ter Keurs and Boyden, 2007, Laurita and Rosenbaum, 2008). Es konnte anhand der Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass die Expression der sarkoplasmatischen Ionenkanäle Serca2a und Ryr2 in ER α OE-Tieren bereits im Grundzustand reduziert ist. Möglicherweise wirkt sich ein verändertes Ca²⁺-signaling bei weiblichen ER α OE-Tieren negativer als bei männlichen Tieren aus, wenn sie dem akuten Stress durch einen Myokardinfarkt ausgesetzt sind.

Wenn sie die akute Phase überlebt hatten, schienen die weiblichen ER α OE-Tiere einen Vorteil aus der Überexpression des ER α zu ziehen. Zumindest für den untersuchten Zeitraum von 14 Tagen nach MI-Induktion waren sie geschützt vor tödlichen Arrhythmien oder Rupturen. Möglicherweise beeinflusst die Überexpression des ER α besonders bei weiblichen Tieren den Prozess des post-infarziellen Gewebeumbaus in positiver Weise. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist in ER α OE-Weibchen die Expression der Fibrosemarker Col1 und Col3 gegenüber WT-Mäusen verringert. Es ist zudem beschrieben, dass durch E2-Stimulation über den ER α die Produktion pro-angiogenetischer Faktoren verstärkt induziert wird (Brouchet et al., 2001, Losordo and Isner, 2001, Pare et al., 2002, Vornehm et al., 2009). In der Tat wurde bei ER α OE-Mäusen eine verstärkte Neoangiogenese nach MI festgestellt (Doktorarbeit X. Zhang). Weniger Fibrose und eine gesteigerte Angiogenese könnten das Überleben der weiblichen ER α OE-Mäuse begünstigen. Somit wäre durch die ER α -Überexpression das Ausmaß des ischämischen Schadens in der akuten Phase nach MI verringert, die Fibrosierung des Myokards reduziert und die Versorgung des nicht infarzierten Herzgewebes während des *Remodelings* besser gewährleistet.

4.2.2 Die ER α -Überexpression hat keinen Einfluss auf die Rupturrate nach MI

Zwischen Tag 2-6 nach der MI-Induktion tendieren männliche Tiere stärker als weibliche Tiere zu Rupturen (Cavasin et al., 2006, Fang et al., 2007, Gao et al., 2005, Wang et al.,

2007). Auch in unserem Falle traten Rupturen ausschließlich bei männlichen Tieren auf, wobei Wildtyp- und ER α OE-Tiere gleichermaßen betroffen waren. In Relation zur totalen Mortalität betrug die Häufigkeit dafür 7-8%.

In der Literatur wird spekuliert, dass weibliche Tiere einerseits durch die protektiven Eigenschaften von Östrogen und andererseits die niedrigere Serumkonzentration von Testosteron vor Rupturen geschützt sind (Cavasin et al., 2003, Cavasin et al., 2006, Gao et al., 2012). Cavasin und Mitarbeiter konnten anhand von ovariectomierten Weibchen bzw. gonadektomierten Männchen, die mit supraphysiologischen Dosen von Östrogen oder Testosteron supplementiert wurden, zeigen, dass Testosteron zu einer dramatisch Erhöhung der Inzidenz von Rupturen nach einem MI führt, während Östrogen der Verschlechterung der Herzfunktion entgegenwirkt. Der Anteil von Todesfällen infolge von Rupturen konnte durch extrem erhöhte Testosterondosen auf 80-90% gesteigert werden (Cavasin et al., 2003).

Dass sich WT- und ER α OE-Tiere hinsichtlich der Rupturrate nicht unterschieden, lässt den Schluss zu, dass die ER α -Überexpression keinen modulierenden Effekt auf die Inzidenz von Rupturen hat und dass ausschließlich der in unseren Experimenten verwendete Mausstamm für die niedrige Rupturrate verantwortlich ist. So wurde berichtet, dass die Rupturrate in Abhängigkeit vom Mausstamm variieren kann. Gao und Mitarbeiter zeigten, dass bei männlichen Tieren die Rupturrate nach MI zwischen 3% (FVB/N), 27% (C57B/6) und 59% (129sv) liegt. Bei weiblichen Tieren waren jeweils signifikant niedrigere Rupturraten beobachtet worden (Gao et al., 2005). Die im Versuch verwendeten Mäuse waren über mehrere Generationen mit dem genetischen Hintergrund B6D2F1, d. h. einer Kombination aus C57B/6- und DBA/2-Mäusen gehalten worden. Zusätzlich wurden die ER α -monotransgenen Mäuse ursprünglich in FVB/N-Mäusen generiert. Die Mischung aus den drei in unseren Experimenten verwendeten Mausstämmen macht einen direkten Vergleich unmöglich, aber annähernd lag die bei uns beobachtete Rupturrate zwischen den für FVB/N- und C57B/6-Mäuse typischen Werten.

4.2.3 ER α OE-Mäuse haben tendenziell kleinere Infarkte als WT-Mäuse

Obwohl keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet wurden, waren die Infarkte der ER α OE-Mäuse tendenziell kleiner als die der WT-Mäuse. Bei ER α OE-Mäusen betrug die Infarktgröße unabhängig vom Geschlecht ungefähr 29% des linken Ventrikels, bei WT-Mäusen dagegen 33% bei Männchen bzw. 35% bei Weibchen.

Studien, die den Einfluss von Östrogen bzw. des ER α auf die Infarktgröße untersuchten (Booth et al., 2003, Booth et al., 2005, Novotny et al., 2009, van Eickels et al., 2003) untermauern diesen Befund. Wir konnten zeigen, dass die ER α -Überexpression zu einer verstärkten Neogenese von Blut- und Lymphgefäßen führt (Doktorarbeit X. Zhang). Hierdurch könnte der Bildung von Ödemen vorgebeugt werden und somit wäre das

überlebende kardiale Gewebe vor den irreversiblen Schäden durch den Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff nach MI geschützt.

4.2.4 Die Herzfunktion nach MI wird durch die ER α -Überexpression nicht beeinflusst

Nach Infarktinduktion unterschieden sich weder die Ejektionsfraktion (EF) noch das LVCO in den untersuchten Gruppen. Für das LVCO konnte eine tendenzielle Reduktion nach Infarkt beobachtet werden. Die Werte sanken in allen Gruppen auf 80-90% des Wertes im Grundzustand. Auch die EF sank auf Werte zwischen 27-34% und lag damit im Bereich, der in vergleichbaren Studien publiziert wurde (Wang et al., 2007, Amorim et al., 2010, van Rooij et al., 2004). Dass sich nach MI-Induktion keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen WT- und ER α OE-Tieren ergaben, zeigt, dass die Infarktinduktion ein zu starker Eingriff ist, als dass die Überexpression des ER α einen modulierenden Effekt innerhalb von zwei Wochen haben könnte. Allerdings könnten sich bei einem längeren Untersuchungszeitraum speziell in weiblichen ER α OE-Mäusen die geringere Fibrose und die gesteigerte Neogenese von Blut- und Lymphgefäßen vorteilhaft auf die Herzfunktion auswirken.

4.3 Einfluss der ER α -Überexpression auf die Mitochondrien

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Östrogenrezeptoren neben ihrer Präsenz im Nukleus und im Zytoplasma auch in Mitochondrien lokalisiert sind (Chen et al., 2004, Pedram et al., 2006, Psarra and Sekeris, 2008). Untersucht wurden hierbei verschiedene Gewebetypen, unter anderem auch neonatale Kardiomyozyten (Jazbutyte et al., 2009). Auch wir konnten den ER α mittels Immunfluoreszenzfärbung in Kardiomyozyten nachweisen. Hierbei wurde neben der zytosolischen und nukleären Lokalisation des ER α auch die mitochondriale Lokalisation des ER α nachgewiesen (Dr. S. Mahmoodzadeh, unpublizierte Daten). Der Befund, dass die mitochondriale DNA (mtDNA) Östrogen-responsive Elemente (ERE) enthält (Chen et al., 2004, Demonacos et al., 1996), lässt vermuten, dass Liganden-gebundene ER direkt die Transkription mitochondrialer Gene beeinflussen können. Der physiologische Nachweis, dass der ER α die Mitochondrienfunktion *in vivo* beeinflusst, wurde anhand von ERKO-Mäusen und ovariectomierten Nagern erbracht. Im Vergleich von ERKO- und Wildtyp-Tieren nach Ischämie/Reperfusion konnte in ERKO-Tieren eine Schädigung der mitochondrialen Struktur und eine verminderte Mitochondrienfunktion nachgewiesen werden (Zhai et al., 2000a). In einem ähnlichen Experiment mit ovariectomierten Mäusen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Östrogensupplementierung dieser Tiere eine geringere Mitochondrienschädigung nach IR bewirkt (Zhai et al., 2000b).

Neben der Wirkung der Östrogenrezeptoren direkt in den Mitochondrien wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen auch untersucht, inwieweit E2 bzw. ER α / β im Kern die

Expression von Faktoren anregt, die die Mitochondrienfunktion und -biogenese beeinflussen. Einer der wichtigsten Regulatoren der mitochondrialen Biogenese und der Fettsäureoxidation ist PGC1 α (Finck and Kelly, 2007, Lehman et al., 2000). Hsieh und Mitarbeiter zeigten in einem T-H-Experiment, dass PGC1 α durch E2-Applikation verstärkt exprimiert wird und dadurch zur Verbesserung der kardialen Funktion führt (Hsieh et al., 2005). PGC1 α stimuliert die mitochondriale Biogenese durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf1 (Wu et al., 1999). Die Expression von PGC1 α wird unter anderem auch durch Mef2 reguliert. Der Transkriptionsfaktor Mef2 spielt eine Rolle bei der Muskelentwicklung und der Ca²⁺-abhängigen Genexpression. Eine Studie der Arbeitsgruppe um Olson zeigte, dass der PGC1 α -Promotor zwei Mef2-Bindungsstellen beinhaltet und dass die PGC1 α -Expression durch Mef2 stimuliert wird (Czubryt et al., 2003). Interessanter Weise wird auch die Expression und funktionelle Aktivität von Mef2 durch Nrf1 kontrolliert (Ramachandran et al., 2008). Somit bilden PGC1 α , Mef2 und Nrf1 eine funktionelle Wechselbeziehung, wobei jedes Protein die Expression des anderen kontrolliert.

Mattingly und Kollegen konnten in Zellkultur zeigen, dass E2 über den ER α die Expression des Transkriptionsfaktors Nrf1 stimuliert und die mitochondriale Biogenese fördert (Mattingly et al., 2008). Nrf1 reguliert die Expression des nukleär kodierten mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (TFAM), welcher nach seiner Translokation in die Mitochondrien die Transkription und Replikation des mitochondrialen Genoms steuert (Gleyzer et al., 2005). Nrfs kontrollieren auf diese Weise die Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung, der mitochondrialen DNA-Transkription und der mitochondrialen Biogenese (Lehman et al., 2000, Puigserver et al., 1998, Scarpulla, 2006).

4.3.1 Die ER α -Überexpression steigert den Gehalt an mitochondrialer DNA

Wir konnten zeigen, dass die Menge an mitochondrialer DNA (mtDNA) bei ER α OE-Tieren um das 2-3fache gegenüber WT-Tieren erhöht war. Durch die Infarktinduktion war eine tendenzielle Reduktion der mtDNA in allen Versuchsgruppen zu beobachten.

Die mitochondriale DNA ist ein 16569bp großes Genom, wobei im kardialen Muskel relativ zum Gehalt an nukleärer DNA zwischen 6970 \pm 920 bis 9235 \pm 5457 Kopien der mtDNA vorliegen (Frahm et al., 2005, Miller et al., 2003). Es umfasst 13 Untereinheiten der Proteinkomplexe der mitochondrialen Atmungskette sowie ribosomale und Transfer-RNAs (Shadel and Clayton, 1997). Die Replikation der mtDNA verläuft unabhängig von der Replikation nukleärer DNA. Trotzdem existieren mitochondriale Faktoren, die nukleär kodiert sind, aber wesentlich an der Replikation der mtDNA beteiligt sind. Wie oben beschrieben wirkt Mef2 über PGC1 α mit Nrf1 und Nrf2 auf TFAM. Nach der Translokation von TFAM in die Mitochondrien wirkt TFAM dort im Wesentlichen als Stabilisator der mtDNA (Kang et al., 2007). Soweit der Mechanismus bisher verstanden ist, stimuliert die DNA-Polymerase γ

(POLG) (Olson et al., 1995) zusammen mit TFAM, der Helikase *Twinkle* und dem *mitochondrial single strand binding protein* (mtSSBP) die Replikation der mtDNA (Ekstrand et al., 2004, Tynismaa et al., 2004, Clay Montier et al., 2009). Es herrschen unterschiedliche Meinungen darüber, ob ein verändertes Niveau an mtDNA Rückschlüsse auf die Vitalität der Mitochondrien und damit des einzelnen Kardiomyozyten zulässt. Es gibt Hinweise, dass ein leicht erhöhtes mtDNA-Niveau protektiv für die Mitochondrienfunktion sein könnte. So kommt es im Verlauf eines Myokardinfarkts infolge erhöhter Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) zur Schädigung und quantitativen Reduktion der mtDNA um bis zu 50% (Ide et al., 2001). Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors TFAM erhöhte die mtDNA-Menge um das ~1,5fache und verbesserte das Überleben nach MI wesentlich (Ikeuchi et al., 2005). Eine weitere Erhöhung des Gehalts an mtDNA um das 2-6fache durch Überexpression von TFAM und/oder der Helikase *Twinkle* führte zur Akkumulation der mtDNA in Form sog. Nucleoide und zur Abnahme der mitochondrialen Funktion im Grundzustand (Ylikallio et al., 2010). ER α OE-Mäuse liegen mit einer 2-3fachen Erhöhung des Gehalts an mtDNA zwischen den oben geschilderten Beispielen. Sie zeigen kein besseres Überleben, allerdings auch keinen Funktionsverlust der Mitochondrien (vgl. Abschnitt 4.3.2). Es ist unklar, wie es zur Erhöhung des Gehalts an mtDNA kommt. Sowohl Mef2a, PGC1 α als auch Nrf1 und Nrf2, d.h. die Kaskade von Regulatoren, die zur gesteigerten Replikation der mtDNA beitragen könnten, wird bei ER α OE-Mäusen schwächer als bei WT-Mäusen exprimiert. Möglicherweise wird bei ER α OE-Mäusen die mtDNA-Stabilität erhöht oder die Aktivität der Enzyme, die an der mtDNA-Replikation beteiligt sind, gesteigert.

4.3.2 Die ER α -Überexpression wirkt im Periinfarktbereich männlicher Mäuse protektiv

Die Untersuchung der Mitochondrienstruktur und -funktion ergab insbesondere für männliche Mäuse einen protektiven Effekt der ER α -Überexpression. Während bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der Messung der mitochondrialen Respiration der scheinoperierten Tiere keine offensichtlichen Unterschiede zwischen WT- und ER α OE-Tieren feststellbar waren, bewirkte die Induktion des MI insbesondere im Periinfarktbereich bei allen untersuchten Gruppen Veränderungen. Myozyten weiblicher Tiere beiderlei Genotyps wiesen im Periinfarktbereich einige zerstörte Mitochondrien auf, die mitochondriale Atmung blieb aber auf dem Niveau scheinoperierter Tiere. Wesentlich stärker ausgeprägte Auswirkungen des MI zeigten sich bei den männlichen WT-Tieren. Bei ihnen war die Anzahl der zerstörten Mitochondrien die höchste aller untersuchten Gruppen. Hierbei waren meistens die Cristae zerrissen oder zumindest die Organisation der Cristae gestört. Zudem war die mitochondriale Funktion im Periinfarktbereich gegenüber dem *Remote*-Bereich signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu wiesen männliche ER α OE-Tiere wesentlich weniger zerstörte Mitochondrien auf und die mitochondriale Atmung war ähnlich wie bei weiblichen

Tieren auf demselben Niveau wie bei scheinoperierten Mäusen. Außerdem war bei männlichen ER α OE-Tieren zu beobachten, dass sich die Mitochondrien in Kardiomyozyten des Perinfarktbereichs um den Zellkern herum gruppierten. Bisherige Studien geben keine Auskunft darüber, ob die Akkumulation von Mitochondrien um den Kern nach MI einen normalen Effekt darstellt. Es gibt Hinweise, dass es sich bei diesen Mitochondrien um erst kürzlich neu generierte Organellen handeln könnte (Davis and Clayton, 1996, Schultz et al., 1998, Tanaka et al., 1998). Darüber hinaus ist es denkbar, dass die Mitochondrien gezielt zum Nukleus transportiert wurden, um die Möglichkeit der Neusynthese von lebenswichtigen Proteinen durch effizientere Energieproduktion zu erhöhen.

5 Zusammenfassung

Klinische und tierexperimentelle Studien belegen, dass E2 und seine Rezeptoren eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen spielen. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher nur ungenügend verstanden. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit der Östrogenrezeptor α (ER α) den Verlauf eines Myokardinfarkts beeinflussen kann. Hierzu diente ein neues Mausmodell mit einer Kardiomyozyten-spezifischen ER α -Überexpression (ER α OE). In diesen Mäusen war die Proteinexpression des kardialen ER α im Vergleich zu WT-Mäusen um das 10-12fache und die Phosphorylierung des ER α , d.h. seine Aktivierung um das 3-5fache erhöht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der ER α bei ER α OE-Mäusen verstärkt im Zellkern lokalisiert war, was ein Indiz dafür sein könnte, dass die Wirkung des ER α als Transkriptionsfaktor bei ER α OE- gegenüber WT-Mäusen verstärkt ist.

Im Grundzustand zeigten ER α OE-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen ein signifikant erhöhtes Herzgewicht, welches mit einem erhöhten linksventrikulären Volumen und einem Längenwachstum der Kardiomyozyten einherging. Zusätzlich war die Expression der Hypertrophiemarkergene NPPA, NPPB und Myh7 gesteigert. Dies sind Merkmale einer ekzentrischen Hypertrophie, wie sie auch bei Schwangeren oder Athleten beobachtet werden können.

Zwei Wochen nach MI konnten weder geschlechts- noch genotypspezifische Unterschiede hinsichtlich der Überlebensrate festgestellt werden. Auffällig war jedoch, dass weibliche ER α OE-Mäuse nach der akuten Phase des MI vollständig überlebten und dass sie als einzige der untersuchten Gruppen weder eine signifikante Zunahme des linksventrikulären Volumens noch eine signifikante reduzierte linksventrikuläre Wanddicke aufwiesen. Zusammen mit dem Befund, dass die Induktion Fibrose-assoziiierter Gene wie Col1 und Col3 bei ER α OE-Weibchen nach Infarkt signifikant schwächer als bei WT-Weibchen ausfiel, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Überexpression des ER α bei Weibchen möglicherweise den Prozess des post-infarziellen Gewebeumbaus positiv beeinflusst. Bei männlichen ER α OE-Mäusen konnte im Vergleich mit WT-Männchen beobachtet werden, dass die Mitochondrienatmung im Periinfarktbereich besser erhalten blieb und dass dies mit einer perinukleären Akkumulation von Mitochondrien in diesem Bereich einherging. Dennoch genügten diese Effekte nicht, um eine Verbesserung des Zustands nach MI zu erreichen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die ER α -Aktivierung in Kardiomyozyten im Speziellen bei weiblichen Tieren einen möglichen Therapieansatz bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung darstellt, welcher zu einem besseren kardialen Remodeling nach Myokardinfarkt führt.

6 Summary

Clinical and experimental studies demonstrate that E2 and its receptors play an important role in the context of cardiovascular disease. However, the underlying mechanisms are yet poorly understood. Aim of this work was to investigate the role of estrogen receptor α (ER α) in the setting of myocardial infarction. For this purpose we generated a new mouse model with cardiomyocyte-specific overexpression of ER α (ER α OE). In these mice protein expression of the cardiac ER α was increased 10-12 fold, and phosphorylation of ER α , ie its activation increased 3-5 fold compared to WT mice. Immunofluorescence data demonstrated a more intense ER α signal in the LV of ER α -OE mice with the strongest signal in the nuclei of cardiomyocytes, indicating a stronger effect of ER α as a transcription factor in ER α OE versus WT mice.

At the basal level ER α OE mice showed a significantly increased heart weight, associated with increased left ventricular volume and cardiomyocyte length compared to WT mice. Additionally the expression of hypertrophy markers NPPA, NPPB and MYH7 was enhanced. These are characteristics of an eccentric hypertrophy and have been observed in hearts during pregnancy or in athlete's hearts after endurance training.

Two weeks after MI, survival analysis proved neither gender nor genotype-specific differences. Strikingly, however, female ER α OE mice completely survived after the acute phase of MI and in contrast to the other groups they exclusively showed neither significantly increased left ventricular volume nor significantly reduced left ventricular wall thickness. Together with the finding that the induction of fibrosis-associated genes Col1 and Col3 turned out significantly weaker in ER α OE females than in WT females after MI, these results suggest that the overexpression of ER α in females may be beneficial during remodeling after MI. Male ER α OE mice showed better maintenance of mitochondrial respiration in the peri-infarct area when compared to WT males. This was associated with a perinuclear accumulation of mitochondria in this area. However, these effects were not sufficient to improve recovery after MI.

In summary, this work shows that, particularly in females, cardiomyocyte ER α could be an interesting therapeutical target in the treatment of coronary heart disease to improve cardiac remodeling after MI.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, K. F., Jr. 2004. Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. *Am J Health Syst Pharm*, **61 Suppl 2**, S4-13.
- Amorim, P. A., Nguyen, T. D., Shingu, Y., Schwarzer, M., Mohr, F. W., Schrepper, A. & Doenst, T. 2010. Myocardial infarction in rats causes partial impairment in insulin response associated with reduced fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **140**, 1160-7.
- Anversa, P., Beghi, C., Kikkawa, Y. & Olivetti, G. 1986. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res*, **58**, 26-37.
- Anversa, P., Capasso, J. M., Sonnenblick, E. H. & Olivetti, G. 1990. Mechanisms of myocyte and capillary growth in the infarcted heart. *Eur Heart J*, **11 Suppl B**, 123-32.
- Anversa, P., Cheng, W., Liu, Y., Leri, A., Redaelli, G. & Kajstura, J. 1998. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, **93 Suppl 3**, 8-12.
- Anversa, P., Loud, A. V., Levicky, V. & Guideri, G. 1985. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *Am J Physiol*, **248**, H876-82.
- Babiker, F. A., Lips, D. J., Delvaux, E., Zandberg, P., Janssen, B. J., Prinzen, F., van Eys, G., Grohe, C. & Doevendans, P. A. 2007. Oestrogen modulates cardiac ischaemic remodelling through oestrogen receptor-specific mechanisms. *Acta Physiol (Oxf)*, **189**, 23-31.
- Bae, S. & Zhang, L. 2005. Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, **315**, 1125-35.
- Band, A. M. & Laiho, M. 2011. Crosstalk of TGF-beta and estrogen receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **16**, 109-15.
- Banerjee, S., Chambliss, K. L., Mineo, C. & Shaul, P. W. 2013. Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids*.

- Bansal, A., Dai, Q., Chiao, Y. A., Hakala, K. W., Zhang, J. Q., Weintraub, S. T. & Lindsey, M. L. 2010. Proteomic analysis reveals late exercise effects on cardiac remodeling following myocardial infarction. *J Proteomics*, **73**, 2041-9.
- Baxter, G. F. 2004. Natriuretic peptides and myocardial ischaemia. *Basic Res Cardiol*, **99**, 90-3.
- Beisvag, V., Kemi, O. J., Arbo, I., Loennechen, J. P., Wisloff, U., Langaas, M., Sandvik, A. K. & Ellingsen, O. 2009. Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, **16**, 690-7.
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*, **128**, 191-227.
- Bjornstrom, L. & Sjoberg, M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, **19**, 833-42.
- Booth, E. A., Marchesi, M., Kilbourne, E. J. & Lucchesi, B. R. 2003. 17Beta-estradiol as a receptor-mediated cardioprotective agent. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**, 395-401.
- Booth, E. A., Obeid, N. R. & Lucchesi, B. R. 2005. Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**, H2039-47.
- Bourdeau, V., Deschenes, J., Metivier, R., Nagai, Y., Nguyen, D., Bretschneider, N., Gannon, F., White, J. H. & Mader, S. 2004. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol*, **18**, 1411-27.
- Braunwald, E. & Bristow, M. R. 2000. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation*, **102**, IV14-23.
- Brouchet, L., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., Bayard, F. & Arnal, J. F. 2001. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation*, **103**, 423-8.

- Brower, G. L., Gardner, J. D., Forman, M. F., Murray, D. B., Voloshenyuk, T., Levick, S. P. & Janicki, J. S. 2006. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg*, **30**, 604-10.
- Brown, D. A., Lynch, J. M., Armstrong, C. J., Caruso, N. M., Ehlers, L. B., Johnson, M. S. & Moore, R. L. 2005. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol*, **564**, 619-30.
- Carroll, J. S., Meyer, C. A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T. R., Eeckhoutte, J., Brodsky, A. S., Keeton, E. K., Fertuck, K. C., Hall, G. F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E. A., Silver, P. A., Gingeras, T. R., *et al.* 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*, **38**, 1289-97.
- Caselli, S., Di Paolo, F. M., Pisicchio, C., Di Pietro, R., Quattrini, F. M., Di Giacinto, B., Culasso, F. & Pelliccia, A. 2011. Three-dimensional echocardiographic characterization of left ventricular remodeling in Olympic athletes. *Am J Cardiol*, **108**, 141-7.
- Cavasin, M. A., Sankey, S. S., Yu, A. L., Menon, S. & Yang, X. P. 2003. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **284**, H1560-9.
- Cavasin, M. A., Tao, Z., Menon, S. & Yang, X. P. 2004. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci*, **75**, 2181-92.
- Cavasin, M. A., Tao, Z. Y., Yu, A. L. & Yang, X. P. 2006. Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, H2043-50.
- Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C. & Yager, J. D. 2004. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**, E1011-22.
- Chen, Q., Williams, R., Healy, C. L., Wright, C. D., Wu, S. C. & O'Connell, T. D. 2010. An association between gene expression and better survival in female mice following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, **49**, 801-11.

- Clay Montier, L. L., Deng, J. J. & Bai, Y. 2009. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics*, **36**, 125-31.
- Cleland, J. G., Swedberg, K., Follath, F., Komajda, M., Cohen-Solal, A., Aguilar, J. C., Dietz, R., Gavazzi, A., Hobbs, R., Korewicki, J., Madeira, H. C., Moiseyev, V. S., Preda, I., van Gilst, W. H., Widimsky, J., Freemantle, N., *et al.* 2003. The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J*, **24**, 442-63.
- Czubryt, M. P., McAnally, J., Fishman, G. I. & Olson, E. N. 2003. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1711-6.
- Davis, A. F. & Clayton, D. A. 1996. In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *J Cell Biol*, **135**, 883-93.
- Degabriele, N. M., Griesenbach, U., Sato, K., Post, M. J., Zhu, J., Williams, J., Jeffery, P. K., Geddes, D. M. & Alton, E. W. 2004. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol*, **89**, 497-505.
- del Monte, F., Lebeche, D., Guerrero, J. L., Tsuji, T., Doye, A. A., Gwathmey, J. K. & Hajjar, R. J. 2004. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5622-7.
- Demonacos, C. V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D. A. & Sekeris, C. E. 1996. Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*, **61**, 226-32.
- Dietz, J. R. 2005. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc Res*, **68**, 8-17.
- Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C. & Frangogiannis, N. G. 2010. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, **48**, 504-11.
- Dorn, G. W., 2nd 2007. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, **49**, 962-70.

- Dorn, G. W., 2nd, Robbins, J., Ball, N. & Walsh, R. A. 1994. Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aortic-banded mice. *Am J Physiol*, **267**, H400-5.
- Dorn, G. W., 2nd, Robbins, J. & Sugden, P. H. 2003. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*, **92**, 1171-5.
- Duvall, W. L. 2003. Cardiovascular disease in women. *Mt Sinai J Med*, **70**, 293-305.
- Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T. Y., Ruan, H., Wang, Y., Toro, L. & Stefani, E. 2005. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res*, **96**, 1208-16.
- Eigel, B. N. & Hadley, R. W. 1999. Contribution of the Na(+) channel and Na(+)/H(+) exchanger to the anoxic rise of [Na(+)] in ventricular myocytes. *Am J Physiol*, **277**, H1817-22.
- Ekstrand, M. I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C. B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C. M. & Larsson, N. G. 2004. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*, **13**, 935-44.
- Ertl, G. & Frantz, S. 2005. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, **66**, 22-32.
- Fagard, R. 2003. Athlete's heart. *Heart*, **89**, 1455-61.
- Fang, L., Gao, X. M., Moore, X. L., Kiriazis, H., Su, Y., Ming, Z., Lim, Y. L., Dart, A. M. & Du, X. J. 2007. Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, **43**, 535-44.
- Ferdinandy, P., Schulz, R. & Baxter, G. F. 2007. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*, **59**, 418-58.
- Ferrari, R. 1995. Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol*, **76**, 17B-24B.

- Finck, B. N. & Kelly, D. P. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*, **115**, 2540-8.
- Frahm, T., Mohamed, S. A., Bruse, P., Gemund, C., Oehmichen, M. & Meissner, C. 2005. Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. *Mech Ageing Dev*, **126**, 1192-200.
- Frangogiannis, N. G. 2012. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*, **110**, 159-73.
- Frey, N. & Olson, E. N. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, **65**, 45-79.
- Gabel, S. A., Walker, V. R., London, R. E., Steenbergen, C., Korach, K. S. & Murphy, E. 2005. Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, **38**, 289-97.
- Gao, X. M., White, D. A., Dart, A. M. & Du, X. J. 2012. Post-infarct cardiac rupture: recent insights on pathogenesis and therapeutic interventions. *Pharmacol Ther*, **134**, 156-79.
- Gao, X. M., Xu, Q., Kiriazis, H., Dart, A. M. & Du, X. J. 2005. Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. *Cardiovasc Res*, **65**, 469-77.
- Gleyzer, N., Vercauteren, K. & Scarpulla, R. C. 2005. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*, **25**, 1354-66.
- Gossen, M. & Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-51.
- Gradman, A. H. & Alfayoumi, F. 2006. From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*, **48**, 326-41.

- Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, K., Stimpel, M., Karas, R. H., Vetter, H. & Neyses, L. 1997. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*, **416**, 107-12.
- Halestrap, A. P., Clarke, S. J. & Khaliulin, I. 2007. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta*, **1767**, 1007-31.
- Hall, C. 2004. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail*, **6**, 257-60.
- Hsieh, Y. C., Yang, S., Choudhry, M. A., Yu, H. P., Rue, L. W., 3rd, Bland, K. I. & Chaudry, I. H. 2005. PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**, H2665-72.
- Hunter, J. J. & Chien, K. R. 1999. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, **341**, 1276-83.
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N. & Takeshita, A. 2001. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*, **88**, 529-35.
- Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A. & Korach, K. S. 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4658-62.
- Ikeuchi, M., Matsusaka, H., Kang, D., Matsushima, S., Ide, T., Kubota, T., Fujiwara, T., Hamasaki, N., Takeshita, A., Sunagawa, K. & Tsutsui, H. 2005. Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation*, **112**, 683-90.
- Jankowski, M., Rachelska, G., Donghao, W., McCann, S. M. & Gutkowska, J. 2001. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11765-70.

- Jazbutyte, V., Kehl, F., Neyses, L. & Pelzer, T. 2009. Estrogen receptor alpha interacts with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, **384**, 450-4.
- Jeanes, H., Newby, D. & Gray, G. A. 2007. Cardiovascular risk in women: the impact of hormone replacement therapy and prospects for new therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother*, **8**, 279-88.
- Jeanes, H. L., Tabor, C., Black, D., Ederveen, A. & Gray, G. A. 2008. Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER)alpha agonist and unaffected by an ER beta antagonist. *J Endocrinol*, **197**, 493-501.
- Johnson, M. S., Moore, R. L. & Brown, D. A. 2006. Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, H2644-47.
- Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R. & Grohe, C. 2000. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*, **275**, 18447-53.
- Kalaitzidis, D. & Gilmore, T. D. 2005. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol Metab*, **16**, 46-52.
- Kang, D., Kim, S. H. & Hamasaki, N. 2007. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, **7**, 39-44.
- Kehat, I. & Molkenin, J. D. 2010. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci*, **1188**, 96-102.
- Kemi, O. J., Ceci, M., Wisloff, U., Grimaldi, S., Gallo, P., Smith, G. L., Condorelli, G. & Ellingsen, O. 2008. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*, **214**, 316-21.
- Kim, H. P., Lee, J. Y., Jeong, J. K., Bae, S. W., Lee, H. K. & Jo, I. 1999. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 257-62.

- Kolodgie, F. D., Farb, A., Litovsky, S. H., Narula, J., Jeffers, L. A., Lee, S. J. & Virmani, R. 1997. Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat. *J Mol Cell Cardiol*, **29**, 2403-14.
- Komuro, I. & Yazaki, Y. 1993. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol*, **55**, 55-75.
- Kuch, B., Muscholl, M., Luchner, A., Doring, A., Riegger, G. A., Schunkert, H. & Hense, H. W. 1998. Gender specific differences in left ventricular adaptation to obesity and hypertension. *J Hum Hypertens*, **12**, 685-91.
- Kudoh, S., Akazawa, H., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Nagai, T. & Komuro, I. 2003. Stretch-modulation of second messengers: effects on cardiomyocyte ion transport. *Prog Biophys Mol Biol*, **82**, 57-66.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R. & Kunz, W. S. 2008. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*, **3**, 965-76.
- Langer, G. A., Weiss, J. N. & Schelbert, H. R. 1987. Cardiac ischemia. Part I--Metabolic and physiologic responses. *West J Med*, **146**, 713-23.
- Laurita, K. R. & Rosenbaum, D. S. 2008. Mechanisms and potential therapeutic targets for ventricular arrhythmias associated with impaired cardiac calcium cycling. *J Mol Cell Cardiol*, **44**, 31-43.
- Lawton, J. S. 2011. Sex and gender differences in coronary artery disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, **23**, 126-30.
- Lee, A. V., Jackson, J. G., Gooch, J. L., Hilsenbeck, S. G., Coronado-Heinsohn, E., Osborne, C. K. & Yee, D. 1999. Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol*, **13**, 787-96.
- Lehman, J. J., Barger, P. M., Kovacs, A., Saffitz, J. E., Medeiros, D. M. & Kelly, D. P. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, **106**, 847-56.

- Leinwand, L. A. 2003. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest*, **112**, 302-7.
- Levin, E. R. 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*, **19**, 1951-9.
- Liu, M. L., Xu, X., Rang, W. Q., Li, Y. J. & Song, H. P. 2004. Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol*, **97**, 485-93.
- Lombardi, F., Sandrone, G., Spinnler, M. T., Torzillo, D., Lavezzaro, G. C., Brusca, A. & Malliani, A. 1996. Heart rate variability in the early hours of an acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, **77**, 1037-44.
- Losordo, D. W. & Isner, J. M. 2001. Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 6-12.
- Luczak, E. D. & Leinwand, L. A. 2009. Sex-based cardiac physiology. *Annu Rev Physiol*, **71**, 1-18.
- Mahmoodzadeh, S., Eder, S., Nordmeyer, J., Ehler, E., Huber, O., Martus, P., Weiske, J., Pregla, R., Hetzer, R. & Regitz-Zagrosek, V. 2006. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J*, **20**, 926-34.
- Mahmoodzadeh, S., Pham, T. H., Kuehne, A., Fielitz, B., Dworatzek, E., Kararigas, G., Petrov, G., Davidson, M. M. & Regitz-Zagrosek, V. 2012. 17beta-Estradiol-induced interaction of ERalpha with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, **96**, 411-21.
- Mattingly, K. A., Ivanova, M. M., Riggs, K. A., Wickramasinghe, N. S., Barch, M. J. & Klinge, C. M. 2008. Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol Endocrinol*, **22**, 609-22.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L. & Olson, E. N. 2000. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14400-5.

- McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M. C., Kang, P. M. & Izumo, S. 2003. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12355-60.
- Mendelsohn, M. E. 2002. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol*, **90**, 3F-6F.
- Mendelsohn, M. E. & Karas, R. H. 2005. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*, **308**, 1583-7.
- Meyer, M. R., Haas, E. & Barton, M. 2006. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension*, **47**, 1019-26.
- Michael, L. H., Entman, M. L., Hartley, C. J., Youker, K. A., Zhu, J., Hall, S. R., Hawkins, H. K., Berens, K. & Ballantyne, C. M. 1995. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*, **269**, H2147-54.
- Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W. & Nagley, P. 2003. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res*, **31**, e61.
- Morkin, E. 2000. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech*, **50**, 522-31.
- Murphy, E. & Steenbergen, C. 2007. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, **75**, 478-86.
- Murphy, E. & Steenbergen, C. 2008. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda)*, **23**, 115-23.
- Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S. & Yeh, Y. H. 2007. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev*, **87**, 425-56.
- Neubauer, S. 2007. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*, **356**, 1140-51.

- Nikolic, I., Liu, D., Bell, J. A., Collins, J., Steenbergen, C. & Murphy, E. 2007. Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective. *J Mol Cell Cardiol*, **42**, 769-80.
- Nordmeyer, J., Eder, S., Mahmoodzadeh, S., Martus, P., Fielitz, J., Bass, J., Bethke, N., Zurbrugg, H. R., Pregla, R., Hetzer, R. & Regitz-Zagrosek, V. 2004. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation*, **110**, 3270-5.
- Novotny, J. L., Simpson, A. M., Tomicek, N. J., Lancaster, T. S. & Korzick, D. H. 2009. Rapid estrogen receptor-alpha activation improves ischemic tolerance in aged female rats through a novel protein kinase C epsilon-dependent mechanism. *Endocrinology*, **150**, 889-96.
- Oka, T. & Komuro, I. 2008. Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure. *Circ J*, **72 Suppl A**, A13-6.
- Olivetti, G., Capasso, J. M., Sonnenblick, E. H. & Anversa, P. 1990. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*, **67**, 23-34.
- Olson, M. W., Wang, Y., Elder, R. H. & Kaguni, L. S. 1995. Subunit structure of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Physical and immunological studies. *J Biol Chem*, **270**, 28932-7.
- Opie, L. H. & Sack, M. N. 2002. Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, **34**, 1077-89.
- Ostadal, B., Netuka, I., Maly, J., Besik, J. & Ostadalova, I. 2009. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Exp Biol Med (Maywood)*, **234**, 1011-9.
- Pare, G., Krust, A., Karas, R. H., Dupont, S., Aronovitz, M., Chambon, P. & Mendelsohn, M. E. 2002. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res*, **90**, 1087-92.
- Patten, R. D., Pourati, I., Aronovitz, M. J., Baur, J., Celestin, F., Chen, X., Michael, A., Haq, S., Nuedling, S., Grohe, C., Force, T., Mendelsohn, M. E. & Karas, R. H. 2004.

- 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res*, **95**, 692-9.
- Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D. C. & Levin, E. R. 2006. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell*, **17**, 2125-37.
- Pelzer, T., Loza, P. A., Hu, K., Bayer, B., Dienesch, C., Calvillo, L., Couse, J. F., Korach, K. S., Neyses, L. & Ertl, G. 2005. Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation*, **111**, 1492-8.
- Petz, L. N. & Nardulli, A. M. 2000. Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Mol Endocrinol*, **14**, 972-85.
- Pierdominici, M., Maselli, A., Colasanti, T., Giammarioli, A. M., Delunardo, F., Vacirca, D., Sanchez, M., Giovannetti, A., Malorni, W. & Ortona, E. 2010. Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett*, **132**, 79-85.
- Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., van der Laarse, A. & van der Wall, E. E. 2000. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, **101**, 336-44.
- Psarra, A. M. & Sekeris, C. E. 2008. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life*, **60**, 210-23.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. & Spiegelman, B. M. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, **92**, 829-39.
- Ramachandran, B., Yu, G. & Gulick, T. 2008. Nuclear respiratory factor 1 controls myocyte enhancer factor 2A transcription to provide a mechanism for coordinate expression of respiratory chain subunits. *J Biol Chem*, **283**, 11935-46.
- Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R. & Tobes, R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**, 326-56.

- Razandi, M., Pedram, A., Park, S. T. & Levin, E. R. 2003. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem*, **278**, 2701-12.
- Regitz-Zagrosek, V. 2006. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 425-38.
- Regitz-Zagrosek, V., Brokat, S. & Tschope, C. 2007. Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis*, **49**, 241-51.
- Regitz-Zagrosek, V., Lehmkuhl, E. & Weickert, M. O. 2006. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol*, **95**, 136-47.
- Reinier, K., Dervan, C., Singh, T., Uy-Evanado, A., Lai, S., Gunson, K., Jui, J. & Chugh, S. S. 2011. Increased left ventricular mass and decreased left ventricular systolic function have independent pathways to ventricular arrhythmogenesis in coronary artery disease. *Heart Rhythm*, **8**, 1177-82.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, 208-12.
- Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Kissela, B. M., *et al.* 2012. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **125**, e2-e220.
- Scarpulla, R. C. 2006. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*, **97**, 673-83.
- Scharhag, J., Schneider, G., Urhausen, A., Rochette, V., Kramann, B. & Kindermann, W. 2002. Athlete's heart: right and left ventricular mass and function in male endurance athletes and untrained individuals determined by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*, **40**, 1856-63.
- Schultz, R. A., Swoap, S. J., McDaniel, L. D., Zhang, B., Koon, E. C., Garry, D. J., Li, K. & Williams, R. S. 1998. Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues. *J Biol Chem*, **273**, 3447-51.

- Shadel, G. S. & Clayton, D. A. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*, **66**, 409-35.
- Shindo, S., Moore, R., Flake, G. & Negishi, M. 2013. Serine 216 Phosphorylation of Estrogen Receptor alpha in Neutrophils: Migration and Infiltration into the Mouse Uterus. *PLoS One*, **8**, e84462.
- Skavdahl, M., Steenbergen, C., Clark, J., Myers, P., Demianenko, T., Mao, L., Rockman, H. A., Korach, K. S. & Murphy, E. 2005. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H469-76.
- Solomon, S. D., Zelenkofske, S., McMurray, J. J., Finn, P. V., Velazquez, E., Ertl, G., Harsanyi, A., Rouleau, J. L., Maggioni, A., Kober, L., White, H., Van de Werf, F., Pieper, K., Califf, R. M., Pfeffer, M. A. & Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial, I. 2005. Sudden death in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction, heart failure, or both. *N Engl J Med*, **352**, 2581-8.
- Stout, M. 2008. Athletes' heart and echocardiography: athletes' heart. *Echocardiography*, **25**, 749-54.
- Sutton, M. G. & Sharpe, N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, **101**, 2981-8.
- Swynghedauw, B. 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, **79**, 215-62.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. & Hirokawa, N. 1998. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*, **93**, 1147-58.
- Tarnavski, O., McMullen, J. R., Schinke, M., Nie, Q., Kong, S. & Izumo, S. 2004. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*, **16**, 349-60.
- Ter Keurs, H. E. & Boyden, P. A. 2007. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev*, **87**, 457-506.

- Thurmond, T. S., Murante, F. G., Staples, J. E., Silverstone, A. E., Korach, K. S. & Gasiewicz, T. A. 2000. Role of estrogen receptor alpha in hematopoietic stem cell development and B lymphocyte maturation in the male mouse. *Endocrinology*, **141**, 2309-18.
- Tomic, D., Frech, M. S., Babus, J. K., Symonds, D., Furth, P. A., Koos, R. D. & Flaws, J. A. 2007. Effects of ERalpha overexpression on female reproduction in mice. *Reprod Toxicol*, **23**, 317-25.
- Tynnismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Holt, I. J. & Suomalainen, A. 2004. Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet*, **13**, 3219-27.
- Umayahara, Y., Kawamori, R., Watada, H., Imano, E., Iwama, N., Morishima, T., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y. & Kamada, T. 1994. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem*, **269**, 16433-42.
- van den Bosch, B. J., Lindsey, P. J., van den Burg, C. M., van der Vlies, S. A., Lips, D. J., van der Vusse, G. J., Ayoubi, T. A., Doevendans, P. A. & Smeets, H. J. 2006. Early and transient gene expression changes in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Genomics*, **88**, 480-8.
- van Eickels, M., Patten, R. D., Aronovitz, M. J., Alsheikh-Ali, A., Gostyla, K., Celestin, F., Grohe, C., Mendelsohn, M. E. & Karas, R. H. 2003. 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, **41**, 2084-92.
- van Rooij, E., Doevendans, P. A., Crijns, H. J., Heeneman, S., Lips, D. J., van Bilsen, M., Williams, R. S., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., Rothermel, B. A. & De Windt, L. J. 2004. MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res*, **94**, e18-26.
- van Wamel, A. J., Ruwhof, C., van der Valk-Kokshoorn, L. J., Schrier, P. I. & van der Laarse, A. 2000. Rapid effects of stretched myocardial and vascular cells on gene expression of neonatal rat cardiomyocytes with emphasis on autocrine and paracrine mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, **381**, 67-73.

- Vitale, C., Mendelsohn, M. E. & Rosano, G. M. 2009. Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. *Nat Rev Cardiol*, **6**, 532-42.
- Volpe, M., Savoia, C., De Paolis, P., Ostrowska, B., Tarasi, D. & Rubattu, S. 2002. The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease. *J Am Soc Nephrol*, **13 Suppl 3**, S173-8.
- Vornehm, N. D., Wang, M., Abarbanell, A., Herrmann, J., Weil, B., Tan, J., Wang, Y., Kelly, M. & Meldrum, D. R. 2009. Acute postischemic treatment with estrogen receptor-alpha agonist or estrogen receptor-beta agonist improves myocardial recovery. *Surgery*, **146**, 145-54.
- Wake, R. & Yoshiyama, M. 2009. Gender differences in ischemic heart disease. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, **4**, 234-40.
- Wang, F., Keimig, T., He, Q., Ding, J., Zhang, Z., Pourabdollah-Nejad, S. & Yang, X. P. 2007. Augmented healing process in female mice with acute myocardial infarction. *Gen Med*, **4**, 230-47.
- Wang, M., Crisostomo, P., Wairiuko, G. M. & Meldrum, D. R. 2006a. Estrogen receptor-alpha mediates acute myocardial protection in females. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, H2204-9.
- Wang, M., Tsai, B. M., Reiger, K. M., Brown, J. W. & Meldrum, D. R. 2006b. 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, **40**, 205-12.
- Weil, J. & Schunkert, H. 2006. [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clin Res Cardiol*, **95 Suppl 4**, 1-15; quiz 16-7.
- Welboren, W. J., van Driel, M. A., Janssen-Megens, E. M., van Heeringen, S. J., Sweep, F. C., Span, P. N. & Stunnenberg, H. G. 2009. ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J*, **28**, 1418-28.
- Wend, K., Wend, P. & Krum, S. A. 2012. Tissue-Specific Effects of Loss of Estrogen during Menopause and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **3**, 19.

- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C. & Spiegelman, B. M. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98**, 115-24.
- Ylikallio, E., Tyynismaa, H., Tsutsui, H., Ide, T. & Suomalainen, A. 2010. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum Mol Genet*, **19**, 2695-705.
- Zhai, P., Eurell, T. E., Cooke, P. S., Lubahn, D. B. & Gross, D. R. 2000a. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H1640-7.
- Zhai, P., Eurell, T. E., Cotthaus, R., Jeffery, E. H., Bahr, J. M. & Gross, D. R. 2000b. Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, H2766-75.
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Chang, S., Antos, C. L., Hill, J. A. & Olson, E. N. 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*, **110**, 479-88.
- Zhang, H., Makarewich, C. A., Kubo, H., Wang, W., Duran, J. M., Li, Y., Berretta, R. M., Koch, W. J., Chen, X., Gao, E., Valdivia, H. H. & Houser, S. R. 2012. Hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808 is not involved in cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res*, **110**, 831-40.
- Zhang, Y., Novak, K. & Kaufman, S. 1995. Atrial natriuretic factor release during pregnancy in rats. *J Physiol*, **488 (Pt 2)**, 509-14.
- Zhao, M. J., Zhang, H., Robinson, T. F., Factor, S. M., Sonnenblick, E. H. & Eng, C. 1987. Profound structural alterations of the extracellular collagen matrix in postischemic dysfunctional ("stunned") but viable myocardium. *J Am Coll Cardiol*, **10**, 1322-34.

Publikationsliste

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, Kotsch K, **Leber J**, Volk HD 2005. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol.* 166(3):811-22.

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, **Leber J**, Volk HD 2006. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol.* 36(1):82-94.

Mahmoodzadeh S, **Leber J**, Zhang X, Jaisser F, Messaoudi S, Morano I, Furth PA, Dworatzek E, Regitz-Zagrosek V 2014 Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-myocardial Infarction. *J Cell Sci Ther* 5: 153.

Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schubert C, Westphal C, **Leber J**, Kusch A, Kararigas G, Fliegner D, Moulin M, Ventura-Clapier R, Gustafsson JA, Davidson MM, Dragun D, Regitz-Zagrosek V. Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by estrogen receptor beta. *Cardiovascular Research* in press