

Aus dem Institut für Pharmakologie
Center for Cardiovascular Research
Direktor: Professor Dr. med. T. Unger
Campus Charité Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Stimulation des Östrogen Rezeptors α in c-kit (+) - Zellen
unterstützt das Überleben von Kardiomyozyten nach
Myokardinfarkt

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Perle Brinckmann

aus Hannover

Gutachter/in: 1.: Prof. Dr. med. Th. Unger
 2.: Prof. Dr. J. Fischer
 3.: Prof. Dr. med. C. Tschöpe

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
	1.1 Der Myokardinfarkt	1
	1.1.1 Epidemiologie des Myokardinfarktes	1
	1.1.2 Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarktes	1
	1.1.3 Komplikationen des Myokardinfarktes	3
	1.2 Östrogenrezeptoren	3
	1.2.1 Östrogenrezeptor alpha und sein Agonist PPT	4
	1.2.2 Östrogenrezeptor beta und sein Agonist DPN	6
	1.2.3 Signalwege	7
	1.3 Östrogene im kardiovaskulären System	10
	1.3.1 Wirkung der Östrogene im kardiovaskulären System	10
	1.3.2 Kontroverse Rolle der Östrogene im Myokardinfarkt	11
	1.4 Im Herzen residierende Stammzellen: das gebrochene Dogma	12
	1.4.1 c-kit	12
	1.4.2 sca-1	13
	1.4.3 GATA-4 und NOTCH-2	14
	1.4.4 c-myc und Tbx3	16
	1.4.5 STAT-3 und Akt	18
	1.5 Kardiale Stammzellen	20
	1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit	21
2	<i>Material und Methoden</i>	23
	2.1 Material	23
	2.1.1 Versuchstiere und Zelllinien	23
	2.1.2 Narkotika und applizierte Substanzen	23
	2.1.3 Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen	23
	2.1.4 Puffer und Lösungen	24
	2.1.5 Kits	25
	2.1.6 Nukleinsäuren und Nukleotide	25
	2.1.7 Reverse Transkription und Verdauungsenzyme	26
	2.1.8 Antikörper	28
	2.1.9 Ausgewählte Geräte	28

2.2	Methoden	29
2.2.1	Versuchstiere: Haltung und Behandlung	29
	2.2.1.1 Applikation von BrdU	29
2.2.2	Chirurgische Eingriffe	29
	2.2.2.1 Narkosen	29
	2.2.2.2 Myokardinfarktinduktion	30
	2.2.2.3 Isolation der Herzen	30
2.2.3	Isolation von c-kit(+)-Zellen und Kardiomyozyten	31
	2.2.3.1 Enzymatischer Verdau	31
	2.2.3.2 Herstellung einer Zellsuspension	31
	2.2.3.3 Zelltrennung mit Percoll	31
	2.2.3.4 MACS – Analyse	32
	2.2.3.5 FACS – Analyse	33
2.2.4	Zellbiologische Methoden	33
	2.2.4.1 Bedingungen der Primärzellkultur	33
	2.2.4.2 Bedingungen der Sekundärzellkultur	34
	2.2.4.3 Zellstimulation	34
	2.2.4.4 Proliferationsmessung mit AP	35
	2.2.4.5 Apoptosemessung	35
	2.2.4.6 Calceinfärbung	36
2.2.5	Molekularbiologische Methoden	37
	2.2.5.1 RNA-Isolation	37
	2.2.5.2 RT-Reaktion zur cDNA-Synthese	37
	2.2.5.3 Semiquantitative PCR	38
	2.2.5.4 Agarose-Elektrophorese	39
	2.2.5.5 Real-Time PCR (quantitative PCR)	39
2.2.6	Immunfluoreszenz	39
	2.2.6.1 Färbung von kultivierten Zellen	39
	2.2.6.2 Färbung von Kryoschnitten	40
	2.2.6.3 Konfokales Mikroskop	41
2.2.7	Proteinbiochemie	41
	2.2.7.1 Western-Blotting	41
2.2.8	Statistische Analysen	42

3	<i>Ergebnisse</i>	43
3.1	Erhöhung des ER α -Proteins in Myokardinfarktgewebe	43
3.2	ER α wird in BrdU(+)-Zellen der Randzone des Infarktes exprimiert	44
3.3	Präsenz des ER α in sca-1(+)/c-kit(+)-Zellen der Perinfarktzone	46
3.4	Ex-vivo Isolation und Charakterisierung von c-kit(+)-Zellen	48
3.5	Untersuchung der Expression von ER α und ER β sowie Proliferationsmarker c-kit(+)-Zellen	51
3.6	c-kit(+)-Population exprimiert Marker früher kardialer Entwicklung	54
3.7	Überlebens-Signalwege in c-kit(+)-Zellen: Akt und STAT3	56
3.8	Funktionelle Relevanz von ER α in der Entwicklung von H9C2-Zellen	57
3.9	Die Rolle von E2 in Differenzierungs- und Proliferationsgenen in der H9c2 Zelllinie	64
3.10	17-beta-Östradiol reduziert durch seine Wirkung auf den ER α Apoptose in Kardiomyozyten in Co-Kultur mit c-kit(+)-Zellen	66
3.11	17-beta-Östradiol unterstützt durch seine Wirkung auf den ER α das Überleben von Kardiomyozyten in Ko-Kultur mit c-kit(+)-Zellen	67
3.12	Kardiale c-kit+-Zellen induzieren nach Stimulation mit PPT Proliferation in einer Ko-Kultur mit H9c2-Kardiomyoblasten	68
3.13	Die parakrine Hypothese: Proliferation von H9c2 unter Behandlung mit dem Überstand prästimulierter c-kit+-Zellen mit PPT	69
3.14	Die parakrine Hypothese: Proliferation von H9c2-Kardiomyoblasten unter Behandlung mit dem Überstand prästimulierter c-kit+-Zellen mit PPT	71
4	<i>Diskussion</i>	72
4.1	Erläuterung zu einigen methodischen Aspekten	72
4.1.1	Zur Wahl des Tiermodells	72
4.1.2	Induktion des AMI in Wistar Ratten: zum zeitlichen Versuchsaufbau	73
4.2	Diskussion der Ergebnisse	73
4.2.1	ER α in Proliferation versus Differenzierung	73
4.2.2	H9c2-Kardiomyoblasten: zur Wahl des Modells	74
4.2.3	Molekulare Merkmale der c-kit+-Zellen und mögliche Ursprünge	75
4.2.4	Proliferative Rolle von ER α in c-kit(+)-Zellen	76

	4.2.5 Eine mögliche protektive Rolle von E2 in c-kit(+)- Zellen der Periinfarktzone vermittelt durch ER α	77
--	---	----

5	<i>Zusammenfassung</i>	81
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	83
7	<i>Danksagung</i>	92
8	<i>Selbstständigkeitserklärung</i>	93
9	<i>Lebenslauf</i>	94
10	<i>Publikation</i>	95

Abkürzungsverzeichnis

AMI	akuter Myokardinfarkt
AO	Acridinorange
AP	Alkalische Phosphatase
BRDU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid
Cyclodextrin	(2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPN	2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitril
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E2	17- β -Estradiol
ER α	Estrogen Rezeptor alpha
ER β	Estrogen Rezeptor beta
ETB	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
HBSS CMF	Hank's Balanced Salt Solution, Calcium and Magnesium free
ICI 182,780	7 α ,17 β -[9[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol
i.p.	Intraperitoneale Applikation
MACS	Magnetic cell sorting
mRNA	messenger Ribonucleinacid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-phycoerythrin
PPT	4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazol-1,3,5-triyl)trisphenol
PVP	Polyninylpyrrolidon
RT	Raumtemperatur
Sca-1	Stem Cell Antigen-1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TdT	Terminale Desoxynukleotid Transferase
TUNEL	TdT- mediated biotin- dUTP nicked- end labelling

1 Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie des Myokardinfarktes

Die koronare Herzkrankheit (KHK) und der akute Myokardinfarkt (AMI), ihre schwerste Komplikation, gelten heute als die häufigste Todesursache der industrialisierten Welt. In der Bundesrepublik Deutschland, wo der AMI und die KHK mit 19% ebenfalls an erster Stelle der Todesursachenstatistik stehen (WHO 2004), ist die ausgeprägte klinische Relevanz unumstritten. Obwohl die Zahl der tödlichen Kreislauferkrankungen seit 1980 um 28% gesenkt werden konnte, erlitten 2006 in der BRD etwa 250.000 Personen einen AMI, 57.788 Personen starben unmittelbar oder an seinen Folgen (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2006), was der Bevölkerung einer normalen deutschen Kleinstadt entspräche.

Von einer KHK sind 5-10% der männlichen Bevölkerung, aber nur 2-3% der Frauen betroffen (Schwanzenbächer P, Innere Medizin, 1998). Diese Diskrepanz spiegelt sich auch in den Sterberaten des AMI wieder: aus allen 2006 verstorbenen Männern in der BRD starben 8,5% an einem AMI, während es bei den Frauen nur 6,4% waren. Zwar steigt die Inzidenz der KHK und des AMI in der weiblichen Bevölkerung in der Altersgruppe der 25-54-Jährigen seit 1998 an, ein Trend der sich vor allem durch den immer früher beginnenden Zigarettenkonsum bei jungen Frauen erklären lässt, dennoch bleiben Männer die Hauptbetroffenen und haben ein 8-fach höheres Risiko im Vergleich zu Frauen der gleichen Altersgruppe, in jungen Jahren einen AMI zu erleiden oder daran zu versterben (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2007).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarktes

Ein Sauerstoffmangel im Herzmuskel aufgrund inadäquater Perfusion des Myokards mit anschließender Ausbildung einer Gewebsnekrose wird als akuter Myokardinfarkt bezeichnet (AMI). In 90% der Fälle findet sich als Grundlage für die Gewebsischämie ein Koronargefäßverschluss durch einen Thrombus auf dem Boden einer zuvor bestehenden KHK (Schwanzenbächer P, Innere Medizin, 1998). Koronarstenosen – also das morphologische Korrelat einer KHK – entstehen am häufigsten durch Atherosklerose. Andere, seltenere Ursachen können Koronarspasmen, Arteritiden, oder auf die Koronararterien übergreifende dissezierende Aneurysmen der Aorta sein.

Die Atherosklerose entsteht bevorzugt in den Koronararterien; ein möglicher Grund hierfür sind die hohen Drücke, denen sie während der Systole durch ihre Ventrikelnähe ausgesetzt

sind, weiterhin vollzieht der Gefäßbaum aufgrund der Herzmorphologie zahlreiche Richtungswechsel, so dass die Intima durch die fortwährenden Scherkräfte zur Fibrosierung angeregt wird (Drexler H, Allg. und Spez. Pathologie, 2004). Die wichtigsten Risikofaktoren zur Entwicklung einer Atherosklerose sind aufgrund epidemiologischer Studien heute weithin bekannt: hierzu zählen die Hypercholesterinämie, die arterielle Hypertonie, der Nikotinabusus und Diabetes mellitus (Kannel WB et al. 1961). Der Einfluss genetischer Faktoren bei der Entstehung der Atherosklerose spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, jedoch sind die Aussagen über ihre Tragweite aufgrund der hohen Komplexität der molekularen Kardiologie derzeit noch uneinheitlich (Yamada Y et al. 2006/ Doevendans PA et al. 2001).

Das Herz besitzt durch die Bildung von Kollateralgefäßen zunächst die Möglichkeit, die Versorgung des Myokards aufrechtzuerhalten, wenn sklerotische Prozesse sich über einen langen Zeitraum hinweg bilden. Erst ab einem Stenosegrad von 75% ist die Koronarreserve erschöpft, die Perfusion des Gewebes wird folglich inadäquat und es kommt – bei vollständig unterbrochenem Blutfluss – bereits nach 20 bis 30 Minuten zur Zellnekrose. Eine häufige Infarktsache ist die plötzliche Ruptur einer atherosklerotischen Plaque durch mechanische und entzündliche Vorgänge mit komplettem Verschluss eines Gefäßes. Drei Stunden nach kompletter koronarer Okklusion bildet sich eine irreversible transmurale Koagulationsnekrose. Die Diffusionsstrecke für den Sauerstoff ist in den subendokardialen Schichten am längsten, folglich ist der Sauerstoffbedarf in diesen Schichten besonders hoch. Die Nekrose bildet sich daher zunächst im Subendokard und breitet sich in subepikardialer Richtung aus. Diese Vorgänge sind variabel, da sich, wie oben erwähnt, bei längerer Stenosierung Kollateralen ausbilden können, die die Ischämietoleranz erhöhen und einen AMI hinauszögern oder das ischämische Gewebe verringern. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Infarktgröße und der Proximität der Stenose zum Abgang der Koronararterie (Drexler H, Allg. und Spez. Pathologie, 2004).

Innerhalb der ersten drei Stunden nach dem AMI finden sich Makrophagen, nach 24 Stunden Lymphozyten ein, sodass es zu einer Entzündungsreaktion mit Ausschüttung von Zytokinen kommt, die – unter anderem – in kardialem Gewebe die weitere Apoptose von Kardiomyozyten einleiten kann, sich demzufolge der Gewebeschaden auch nach dem Infarkt ereignis ausweitet.

1.1.3 Komplikationen des Myokardinfarktes

Zu den wichtigsten frühen Komplikationen gehören mit einer Auftrittsrate von 90% die Herzrhythmusstörungen, unter denen die Sinusbradykardie die häufigste darstellt. Ein Drittel der Patienten leidet unter tachykarden Herzrhythmusstörungen, deren Ursachen eine Linksherzinsuffizienz, Hypovolämien, Schmerzen, aber auch Angstzustände sein können. Kammerflimmern tritt vorwiegend während der ersten vier Stunden nach Infarktbeginn auf und betrifft 4-18% aller AMI-Patienten; die Prognose ist ungünstig, da ein in der Postinfarktphase aufgetretenes Kammerflimmern auf eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion hinweist. Weitere gefürchtete Komplikationen sind der kardiogene Schock, der Ausdruck einer ischämischen Beeinträchtigung einer Muskelmasse von mehr als 40% ist, sowie der seltene, aber zu schweren Mitralinsuffizienzen führende Papillarmuskelabriss. Bei einem Viertel der Patienten tritt eine hämodynamisch wenig relevante Mitralinsuffizienz auf, die sich im Verlauf häufig regredient zeigt (Schwanzenbbächer P, Innere Medizin, 1998).

Zu den mittel- bis spätfristigen Komplikationen zählt unter anderem das Dressler-Syndrom, bei dem eine Perikarditis und Pleuritis, häufig mit Leukozytose und Fieber einhergehend, auftreten kann. Meist ereignet es sich innerhalb der ersten sechs Wochen nach dem Infarkt.

Die schwerwiegendste Spätkomplikation des AMI ist die Herzinsuffizienz, die bei Patienten über 65 Jahren die am häufigsten gestellte Diagnose in Krankenhäusern ist. Sie ist Ausdruck einer durch das in Narbengewebe umstrukturierte Myokard beeinträchtigten Pumpfunktion, kann aber auch nach dem AMI durch narbig umgewandelte Herzwandaneurysmata und (höhergradige Klappeninsuffizienzen) entstehen (Drexler H, Allg. und Spez. Pathologie, 2004).

1.2 Östrogenrezeptoren

Östrogene vermitteln ihre Wirkung in ihren verschiedenen Zielgeweben hauptsächlich über zwei Rezeptoren: Die Östrogenrezeptoren alpha und beta ($ER\alpha$ und $ER\beta$). Sie gehören der größten Familie bekannter Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten an, den Steroidrezeptoren. Diese werden auch als nukleäre Rezeptoren bezeichnet werden, da sie in der Lage sind, nach ihrer Aktivierung in den Nukleus zu translozieren und dort die Transkription östrogenassoziierter Gene zu initiieren. Andere Mitglieder dieser Familie sind die Steroidrezeptoren für Progesteron, Androgene, Glucocorticoide, sowie Rezeptoren für Vitamin D, Retinoidsäure und das Thyroidhormon. Die DNA-Sequenzen der Steroidrezeptoren sind hochgradig konserviert und weisen Sequenzhomologien auf, aufgrund

derer ihre Rezeptorstruktur in die Regionen A-F eingeteilt wurde (Green S et al. 1986 / Becker-Andre et al. 1993). Die Regionen A und B befinden sich am N-Terminus des Proteins, sind am geringsten konserviert, schwanken daher in Größe und Aminosäuresequenz. Hier befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (AF1), die die Aktivierung der Transkription östrogenregulierter Gene ermöglicht und andere Transkriptionsfaktoren rekrutiert. Es schließt sich die hoch konservierte C-Region an, deren Funktion darin besteht, über zwei Zinkfingerformationen die Dimerisierung des Rezeptors einzuleiten und seine Bindung an die DNA zu vermitteln. Die D-Region enthält eine Signalsequenz, die zur Kernlokalisierung des Rezeptors dient und je nach nukleärem Rezeptortyp sehr variabel sein kann. Die Östrogenrezeptoren weisen hier eine zweite Transaktivierungsdomäne auf (AF2) und bindet die als „Chaperon“ bezeichneten Hitzeschockproteine (Hsp). Verschiedene Funktionen werden durch die E-Region erfüllt: hier erfolgt die Ligandenbindung, sie spielt aber ebenfalls eine Rolle in der Kernlokalisierung und der Dimerisierung. Die F-Region liegt am C-Terminus des Rezeptorproteins und erfüllt keine sicher bestätigte Funktion, es wird jedoch postuliert, dass sie – wie Region E – eine Rolle bei der Bindung von Liganden spielt (Giguere V et al. 1987 / Pike AC et al. 2000). ER α und ER β vermitteln als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren die Östrogenwirkung in die Expression eines weiten Netzes hormonresponsiver Gene (Kosztin D et al. 1997/ Flötotto T 2001).

1.2.1 Östrogenrezeptor alpha und sein Agonist PPT

Das Gen des ER α liegt im humanen Genom auf Chromosom 6 und besteht – wie die Gene aller Steroidrezeptoren - aus 8 Exons. Das Protein ER α umfasst 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 65.000 kD. Exon 1 und 2 kodieren für die Region A und B (s. oben) des ER α und enthalten somit die Transaktivierungsdomäne 1, die im ER α konstitutiv aktiviert ist und gewebespezifische Effekte auf das Transkriptionsniveau ausübt. Die DNA-bindende Domäne des ER α besteht aus zwei Zinkfingern, die in der C-Region lokalisiert sind und von Exon 3 und 4 kodiert werden; während der erste Zinkfinger das ERE-Element (Estrogen-responsive-element) der DNA bindet, stabilisiert der zweite Zinkfinger das Protein während der Bindung durch Ionenbindung mit den Phosphatgruppen der DNA (Green et al. 1986/ Flötotto T 2001/ Katzenellenbogen BS 1996). Die Hormon-bindende Domäne (HBD) wird von Exon 5 bis 8 kodiert und besteht aus 12 α -Helices die eine Bindung des Liganden durch Bildung einer Tasche ermöglichen (Dutertre M et al. 2000).

Die Verteilung des ER α in den verschiedenen Geweben unterscheidet sich beträchtlich von der Expression des ER β . Koexpression beider Rezeptoren findet sich in den Knochen, der

Hypophyse und dem kardiovaskulären System. ER α wird zudem vor allem im Uterus, der Vagina, den Thekazellen des Ovars der Mamma, der Leber und dem Hypothalamus exprimiert (Hillisch A et al. 2004 / Harris et al. 2002).

Eine in der Onkologie sehr beachtete Tatsache ist die Eigenschaft des ER α zur Promotion proliferativer Prozesse in der Zelle. Dies konnte vor allem im Mamma-Karzinom, aber auch im Uterus sowie in der Angiogenese gezeigt werden. Hierbei kann bereits die Mutation eines Serinrestes im ER α zu antiproliferativen Effekten führen (Razandi M et al. 2002).

Im Myokardinfarkt werden ER α zahlreiche positive Effekte zugeschrieben. ER α übt hier beispielsweise seine proliferativen Eigenschaften in endothelialen Progenitorzellen aus, die wahrscheinlich durch ER α -vermittelte Prozesse rekrutiert werden und zur Neovaskularisation des Infarktgebietes beitragen (Dupont S et al. 2000). Ein wichtiger Aspekt für die Prognose von Patienten mit Myokardinfarkt ist das Ausmaß der myokardialen Schädigung. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von ER α einen limitierenden Effekt auf die Infarktgröße hatte. Unter anderem konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass ER α das Vorkommen von Reperfusion-Traumata durch die Reduktion kardialer Arrhythmien entscheidend senken konnte (Booth EA 2005). In ER α KO Mäusen (ER α Knock Out Mäuse) hingegen zeigten sich mehr Arrhythmien nach Reperfusion, sowie ein größeres Infarktgebiet als in Wildtyp-Mäusen. Ein möglicher Mechanismus ist die durch ER α hervorgerufene Senkung der Konzentration des Tumornekrosefaktors α (TNF α), der im ischämisch geschädigten Myokard wahrscheinlich proapoptotische Wirkungen in Kardiomyozyten ausübt (Xu Y et al. 2006).

PPT (4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazol-1,3,5-triyl)trisphenol) ist ein synthetischer ER α Agonist, der im Vergleich zum ER β mit einer 400 fachen Affinität den ER α bindet, also hochselektiv ist. Im Jahr 2000 durch Stauffer und Katzenellenbogen entwickelt, handelt es sich um eine nichtsteroidale Substanz. PPT besteht aus einem Pyrazol-Gerüst, das an den 3-,5-Positionen mit Phenolgruppen und an der 4-Position mit einer Alkylgruppe substituiert wurde. Seine Selektivität für ER α erhält PPT durch einen Unterschied in der Ligandenbindungstasche von ER α im Vergleich zu ER β , die sich in nur zwei Aminosäuren unterscheiden; Im Fall von ER β befindet sich in der einen Position ein Methionin, wogegen im ER α hier ein Leucin liegt, dessen Rest kleiner ist. Bindet PPT an ER β , verschiebt sich die Lage des Liganden in der Bindungstasche durch den größeren Methioninrest zu einer ungünstigeren Konformation, so dass die Bindungsaffinität zum Rezeptor herabgesetzt ist (Stauffer et al. 2000). PPT ahmt als ER α Agonist die über diesen Rezeptor vermittelten

Wirkungen nach; Es aktiviert Gene, die exklusiv von ER α aktiviert werden und bewirkt in Mäusen eine Zunahme des Uterusgewichts, eine Abnahme des Gesamtcholesterins im Plasma um 50%, sowie eine geringere Abnahme der Knochendichte nach Ovariectomie als in unbehandelten Kontrollen. Effekte, die dem ER α zugeschrieben werden (Chang EC et al. 2008).

1.2.2 Östrogenrezeptor beta und sein Agonist DPN

Der Östrogenrezeptor beta (ER β) wurde durch Gustafsson 1996 erstmals in Prostatagewebe kloniert. Bis zum damaligen Zeitpunkt war man von nur einem Östrogenrezeptor zur Vermittlung der Östrogeneffekte ausgegangen. Bald nach der Entdeckung des ER β wurde deutlich, dass beide Rezeptoren in einer komplementären Beziehung zueinander stehen, so dass das Feld der Östrogenaktion im Organismus sich zugleich vergrößerte aber auch komplexer gestaltete. ER β soll demnach nach der „Ying und Yang Theorie“ die von ER α aktivierte Transkription modulieren und in Geweben, in denen ER α nicht exprimiert wird seine Funktion wahrnehmen (Lindberg et al. 2003). Zugleich finden sich gegensätzliche Aktionen in der Gentranskription: So aktiviert ER α die Transkription von Genen, die das Aktivator-Protein-1 enthalten (AP-1), während ER β die Transkription dieser Gene inhibiert (Paech et al. 1997). ER β wird von einem anderen Gen als ER α - auf Chromosom 14 - kodiert und entsteht nicht, wie andere Steroidrezeptoren, durch alternative Transkription oder Translation des gleichen Gens (Keightley MC, 1998). Beide ER weisen sowohl sehr unterschiedliche Domänen mit nur 20% Übereinstimmung der Sequenz (Region A und B), sowie auch große Sequenzhomologien, z.B. in der Region C auf, sodass beide Rezeptoren das gleiche ERE (Estrogen Responsive Element) binden. Obwohl es Hinweise gibt, dass ER β sich in seinen Bindungseigenschaften zu seinen Liganden von ER α unterscheidet, binden beide Rezeptoren 17- β -Östradiol (E2) mit der gleichen Affinität trotz einer Sequenzhomologie der beiden Ligandenbindungsdomänen von nur 58%. (Ogawa et al.1997). ER β aktiviert die Transkription verschiedener Gene, die nur teilweise identisch mit den von ER α aktivierten Genen sind. Dies ist möglicherweise die Folge unterschiedlicher Sequenzen in der aminoterminalen A/B-Region des Rezeptors. Die ER β -induzierte Transkription ist – wie auch bei ER α - abhängig vom Zelltyp und der Promotoraktivität (Katzenellenbogen BS et al. 2000).

Wie unter Punkt 1.2.1 erwähnt, findet sich in bestimmten Geweben – Herz, Gefäße, Knochen, Hypophyse – eine Koexpression beider Rezeptoren. Alleinige oder dominante Expression von

ER β konnte in der Lunge, der Blase, dem Hoden, den Granulosazellen des Ovars und dem Hypothalamus nachgewiesen werden (Hillisch A et al. 2004). Östradiol ist ein wichtiger Faktor zur Erhaltung der Knochenmasse, einer Größe, die in positiver Korrelation mit der Östradiol-Plasmakonzentration steht (Greendale GA et al. 1997). Dieser Effekt wird höchstwahrscheinlich vornehmlich durch den ER β vermittelt, da bestimmte ER β -Polymorphismen mit verminderter Knochenmasse einhergehen (Shearman AM et al. 2004). ER β KO Mäusen (ER β Knock Out Mäuse) weisen fünf Monate nach ihrer Geburt bereits einen Hypertonus auf, dessen Pathomechanismus ungeklärt ist. Mit einem Jahr treten bei ER β KO Mäusen dilatierte Ventrikel mit histologischen Hypertrophiezeichen, sowie eine verstärkte Transkription des „ β -myosin-heavy-chain-Proteins“ auf, was auf eine Volumen- und Drucküberlastung des Herzens hindeutet. Ein Zusammenhang besteht auch zwischen der Bildung atherosklerotischer Plaques der Koronargefäße und bestimmter ER β -Polymorphismen (Christian RC et al. 2006). Die genauen Mechanismen des ER β im kardiovaskulären System bleiben jedoch noch unverstanden.

Diarylpropionitril (DPN) wurde 2001 als ER β -Agonist von Meyers und Katzenellenbogen synthetisiert. Zwar bindet DPN beide ER's, jedoch mit einer 70-fach erhöhten Affinität an ER β . In Transkriptionssays entwickelt DPN in ER β -aktivierten Genen eine 170-fache Potenz im Vergleich zu ER α -aktivierten Genen (Meyers MJ et al. 2001). DPN ist ein chirales Molekül, existiert also als S- und R-Enantiomer. Die Affinität von DPN zum ER β wird maßgeblich durch die Aminosäuresequenz der Ligandenbindungstasche des Rezeptors bestimmt; Wird im ER α die Aminosäure Leu 384 mit dem ER β -spezifischen Met 336 vertauscht, zeigt ER α eine ähnliche Affinität zu DPN wie ER β . Eine Rolle in der Determinierung der Bindungsaffinität zwischen ER β und seinem Liganden DPN spielt zudem die dritte Helixstruktur der Rezeptorbindungstasche. Molekulare Modellierung konnte weiterhin zeigen, dass das S-Enantiomer von DPN in struktureller und energetischer Hinsicht für die hohe Affinität zu ER β verantwortlich ist. Der Nitril-Anteil von DPN kann in dieser Position mit dem oben erwähnten Met 336 von ER β energetisch sinnvoll kommunizieren (Sun J et al. 2003).

1.2.3 Signalwege

Wie bis zum heutigen Zeitpunkt bekannt, werden die intrazellulären Östrogenaktionen über zwei fundamental unterschiedliche Signalwege vermittelt: den „klassischen“ Weg über ER α /ER β und den daraus resultierenden genomischen Effekten, sowie den „nicht-

genomischen“ Weg, der die schnellen östrogenregulierten Aktionen innerhalb der Zelle umfasst, wie die Öffnung und Schließung von Ionenkanälen und die Aktivierung verschiedener zytoplasmatischer Kaskaden.

Der Östrogenrezeptor vermittelte Weg umfasst die Bindung des lipophilen, membrangängigen 17- β -Östradiol (E2) an den sich intrazellulär befindenden Östrogenrezeptor (ER). Dieser wird mit seinem Liganden E2 (ER-E2) über eine Aminosäuresequenz in seiner D-Region in den Nukleus lokalisiert. Als Bindungsort für den ER-E2 konnte eine palindromische Sequenz festgestellt werden, die ERE (Estrogen-responsive-Element) genannt wird. Über 70.000 ERE's konnten im Human- und Mäusegenom entdeckt werden, ca. 17000 befanden sich proximal zu DNA-Startsequenzen (Bourdeau V et al. 2004). Das „Ur-ERE“ 5'-GGTCACAGTGACC-3' wurde im Vitellogenin A2-Gen von *Xenopus laevis* entdeckt, und funktioniert unabhängig von Leserichtung und Distanz, was für seine Funktion als „Enhancer“, also Transkriptionsaktivator, spricht (Beato M et al. 1989/ O'Malley BW 2005). Der Rezeptor bindet die DNA als Hetero- oder Homodimer und erkennt sein DNA-Motiv über eine Zink-Finger-Formation seiner C-Domäne, mit der er hochspezifisch bindet. Ein Auswechseln von nur drei Aminosäuren innerhalb des Zinkfingers verhindert dies bereits (Kosztin D et al. 1997). Eine Determinante der Bindungsqualität ist auch die Sequenz des ERE: ER α beispielsweise bindet das ERE aus dem Vitellogenin A2 mit hoher Affinität im Gegensatz zu modifizierten ERE-Sequenzen anderer Gene (z.B. Oxytocin-Gen). ER-E2 kann sich zusätzlich von den ERE's grundsätzlich unterscheidende Promotoren binden: dies jedoch nur indirekt über einen zweiten Transkriptionsfaktor, was als „transkriptionaler cross-talk“ bezeichnet wird und auf 35% der östrogenresponsiven Gene zutrifft. Ein wichtiges Protein ist in diesem Zusammenhang Sp-1 (Stimulating Protein-1), das die indirekte Bindung zwischen ER-E2 und der DNA vermittelt. Sp-1 wird an den ER gebunden und erhöht die Bindungsaffinität verschiedener für den Ablauf der Transkription benötigte Koaktivatoren. Beispiele für Gene, die durch indirekte Bindung des ER-E2-Komplexes über Sp-1 vermittelt werden sind zum Beispiel das LDL-Rezeptor Gen und das Cyclin D1-Gen (Marino M et al. 2006).

Die Bildung einer funktionsfähigen Transkriptionsplattform setzt für den ER – sowohl für die direkte als auch für die indirekte Form der DNA Interaktion – die Bindung der Elemente der basalen Transkriptionsmaschinerie sowie anderer Hilfsproteine voraus. Zur Bindung an diese Faktoren benötigt der ER-E2 die Vermittlung durch einen großen Kofaktor-Komplex, TRAP/DRIP (thyroid hormone receptor associated protein/vitamin D receptor-integrating protein) genannt. Ein wichtiger Koaktivator des ER-E2-Komplexes sind zudem auch die SRC

Proteine (Marino M et al. 2006 / McKenna1 NJ et al. 999). Zudem ist eine Aufhebung der chromatin-abhängigen Inhibition zum Beginn der Transkription notwendig; dies wird durch die Histon-Acetyl-Transferase vorgenommen. Inhibitoren der ER-E2-vermittelten Transkription konnten mit dem RIP-140 (receptor-interacting-protein-140) und seinem sogenannten „short-heterodimer-partner“ beschrieben werden. Durch ihre Antagonisierung der SCR-Proteine wird eine Transkription der Zielgene des ER-E2-Komplexes verhindert (Augereau P et al. 2006). Zu den Einflussfaktoren, die in den ER-DNA-Bindungsprozess eingreifen und in der Transkription eine Rolle spielen, gehören neben der oben erwähnten DNA-Sequenz und den Koaktivatoren und Repressorproteinen auch der Zelltyp, sowie die Azetylierung und Methylierung bestimmter Proteinreste des ER. Letzterer Prozess geschieht im Sinne einer post-translationalen Modifikation der Koaktivatoren und der ER-Proteine, indem die Proteinoberfläche durch Modifikation der Aminosäurereste geändert wird und so bestimmte Protein-Protein-Interaktionen im Transkriptionsapparat nicht mehr stattfinden können (Kim J 2006 / Marino M et al. 2006).

Dass E2 Effekte über „nicht-genomische“ Signalwege ausüben kann, wurde deutlich, als im Uterus einer Ratte eine Östrogen-induzierte Steigerung des cAMP-Spiegels nach nur 15 Sekunden festgestellt wurde. Eine genomische Übersetzung einer Stimulation durch E2, folglich eine Veränderung der Genexpression und daraus resultierende zytoplasmatische Änderungen sind frühestens nach zwei Stunden messbar. Diese schnellen Effekte werden durch membrangebundene Formen der Östrogenrezeptoren vermittelt, die Konzentrationen von sekundären Botenstoffen erhöhen. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass E2 in Gefäßen unter physiologischen und suprphysiologischen Bedingungen den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht, der zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Kinase führt (PKG), die Kalium-Ionenkanäle öffnet, sodass ein Ausstrom der K⁺ Ionen aus der Zelle stattfindet. Dies hemmt den Kalziumeinstrom in die Zelle, sodass es zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur kommt (Freay AD et al. 1997). Über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus aktivieren membranassoziierte Östrogenrezeptoren in Gefäßendothelien über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PDK-1) die Serin-Threonin-Protein-Kinase Akt, die über die Phosphorylierung der NOS (nitric oxide Synthase) die Synthese von NO einleitet (Leung S et al. 2007 / Haynes MP et al. 2000). Die nicht-genomischen Signalwege der membrangebundenen Östrogenrezeptoren beeinflussen andere Signalwege, wie die des Insulin-like Growth Factors-1 und des Epidermal-Growth-Factors, sodass E2 eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation zukommt (Yager JD et al. 2006).

1.3 Östrogene im kardiovaskulären System

1.3.1 Wirkung der Östrogene im kardiovaskulären System

Die Anzahl der experimentellen Arbeiten, die sich mit der Östrogenwirkung innerhalb des kardiovaskulären Systems beschäftigen, nimmt, seitdem in klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass prämenopausale Frauen – verglichen mit Männern ihres Alters - ein signifikant geringeres Risiko haben eine KHK oder einen akuten Myokardinfarkt (AMI) zu entwickeln, ständig zu. Die Rolle der Östrogene in Herz und Gefäßen ist vielseitig und komplex. Hier sollen einige wichtige Wirkungen beschrieben werden. Beide Östrogenrezeptoren (ER) werden in den Gefäßen und verschiedenen kardialen Zellen - einschließlich Kardiomyozyten - exprimiert beider Geschlechter (Mendelsohn et al. 1999). Die Präsenz des ER α kann sowohl im Zytoplasma, dem Nukleus, als auch der Membran von Kardiomyozyten detektiert werden, sowie in Gefäßendothelien und glatten Muskelzellen der Gefäße (VSMCs) (Leung S et al. 2007/ Ropero AB et al. 2006). ER β konnte ebenfalls im Herzen und VSMCs identifiziert werden, und ist in seiner Expression im Gegensatz zu ER α stark mit dem Vorkommen atherosklerotischer Plaques assoziiert, was seine Rolle in Kalzifizierungsprozessen der Gefäße impliziert (Mahmoodzadeh S et al. 2006 / Christian RC et al. 2006). Niedrige Vorkommen des ER α in den Gefäßen korrelieren wiederum mit erhöhtem Arterioskleroserisiko (Losordo et al. 1994).

E2 senkt über verschiedene Mechanismen den arteriellen Blutdruck (RR). Es senkt die Expression von Renin und ACE, steigert die Produktion des Atrial Natriuretic Peptide (Jankowski M et al. 2001) und wirkt über verschiedene Mechanismen als Vasodilatator. (Leung S et al. 2007 / Haynes MP et al. 2000). Hinzu kommen positive Effekte auf das Lipidprofil und die Gefäße durch Prävention der Oxidation von LDL (Low Density Lipoprotein) und antioxidative Eigenschaften (Booth EA et al. 2003 / Sack et al. 1994). Im Myokardinfarkt werden Kardiomyozyten aufgrund von Sauerstoffmangel, aber auch durch entzündliche Prozesse apoptotischen Prozessen unterworfen. Auf Autopsien basierende Studien konnten zeigen, dass in weiblichen - normalen und insuffizienten - Herzen weniger Apoptose in Kardiomyozyten stattfindet, als in männlichen Herzen (Guerra S et al. 1999 / Olivetti G et al. 1997). Dies mag einerseits daran liegen, dass 17- β -Östradiol (E2), wie unter Punkt 1.2.3 beschrieben, intrazytoplasmatische Kinase Akt aktiviert, die über zwei Signalkaskaden die Apoptose der Zelle inhibiert, aber andererseits auch daran, dass E2 Sauerstoffradikale (ROS) inhibiert, die in großen Mengen im Myokardinfarkt entstehen, hauptsächlich aus den Mitochondrien der Kardiomyozyten stammen und proapoptisch

wirken. Dies geschieht durch Vermittlung des Signalmoleküls PDK-1 (Kim KJ et al. 2005 / Patten RD et al. 2004). E2 senkt auch die Konzentration von TNF α nach induziertem Myokardinfarkt im linken Ventrikel. TNF α führt in ischämischem Gewebe zu Koronarspasmen, die die Gewebeperfusion weiter senken. Zudem senken Östrogene möglicherweise die Expression von TNFR-1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1), über den TNF α hauptsächlich seine proapoptischen Signale in die Zelle vermittelt (Xu Y et al. 2005). Zuletzt konnte die Gabe von E2 und dem ER α Agonisten PPT 30 Minuten vor Okklusion einer Koronararterie die Infarktgröße im Vergleich zur Placebogruppe in Kaninchen signifikant verkleinern, was auf eine ER α -vermittelte Protektion des Myokards hindeutet (Booth EA et al. 2005).

1.3.2 Kontroverse Rolle der Östrogene im Myokardinfarkt

In den letzten zwei Dekaden sind geschlechterspezifische Unterschiede bezüglich der Häufigkeit, des Verlaufs und der Letalität des AMI und seiner Folgen in einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten untersucht worden. Der Tatsache, dass prämenopausale Frauen ein geringeres Risiko haben, einen Myokardinfarkt zu erleiden (Adams KF et al. 1999), schließt sich die häufig kontrovers diskutierte Frage an, ob Östrogene auch nach der Menopause protektive Effekte im kardiovaskulären System ausüben und Patientinnen von einer postmenopausalen hormonellen Substitution (HS) tatsächlich profitieren. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die unter HS beschriebene erhöhte Inzidenz von Mamma- und Endometriumskarzinomen (Colditz GA et al. 1995). In einer 1995 beendeten, drei Jahre umfassenden Nachbefragung im Rahmen der „Nurses’ Health Study“ konnte ein um den Faktor 1.46 erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines invasiven Mamma-Karzinoms unter Östrogen-Substitution und Östrogen-Progestin Substitution ermittelt werden (Keller KB et al. 2005). In der „Women’s Health Initiative“, sowie in einer Reihe anderer Studien wurde auch auf kardiovaskulärem Gebiet kein protektiver Effekt einer HS festgestellt. Innerhalb des ersten Jahres konnte sogar ein Anstieg kardiovaskulärer Ereignisse verzeichnet werden, sodass die Studie vorzeitig abgebrochen wurde. Jedoch zeigten sich nach vierjähriger HS weniger Myokardinfarkte als in der Placebo-Gruppe, was dennoch für positive Langzeiteffekte der Östrogene im kardiovaskulären System sprechen könnte. Obwohl der erhoffte präventive Charakter einer HS sich in mehreren klinischen Studien nicht bestätigen konnte (Manson J et al. 2003/ Hulley S et al. 1998 / Nelson HD et al. 2002), wurde in zahlreichen experimentellen und klinischen Beobachtungen gezeigt, dass Östrogene über verschiedene Mechanismen den Verlauf und die Regeneration des Myokardinfarkts positiv

beeinflussen. Daten aus der oben bereits erwähnten „Nurses’ Health Study“ zeigten ein signifikantes, um 50% reduziertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse in hormonsubstituierten Frauen (Östrogen allein und in Kombination mit Progesteron).

Studien, die sich ausschließlich mit der Wirkung von E2 in Männern mit kardiovaskulärem Risiko befassen, zeigen ebenfalls positive lang- und kurzzeitige Effekte. So steigert eine Gabe von E2 den koronaren Blutfluss nach bereits 15 Minuten in männlichen Patienten mit Koronarsklerose, womit in beiden Geschlechtern eine anti-ischämische Wirkung von E2 deutlich wird (Blumenthal RS et al. 1997). Weiterhin haben Männer mit höheren E2-Serumkonzentrationen ein signifikant geringeres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Ärnlöv J et al. 2006)

Tierexperimentelle Ansätze in Myokardinfarktmodellen zeigen eine durch Östrogengabe induzierte geringere Infarktgröße im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren, zudem positive hämodynamische Effekte der Östrogene (Patten RD et al. 2004). Die Lage der Daten deutet darauf hin, dass die Effekte der Östrogene in Herz und Gefäßen nicht einheitlich als „gut“ oder „schlecht“ zu bewerten sind. Es bleibt daher ein wichtiges Ziel die positiven Mechanismen der Östrogene auf das Myokard unmittelbar nach dem Infarkt zu verstehen. (Mendelsohn et al. 2005 /Booth EA et al. 2005).

1.4 Im Herzen residierende Stammzellen: das gebrochene Dogma

1.4.1 c-kit

Das Protoonkogen c-kit (Synonym: CD 117) wurde zunächst im Genom von *Felis catus* (Hauskatze) als ein zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-kit beschrieben (Yarden Y et al. 1987). Das c-kit-Gen liegt im humanen Genom auf Chromosom 4 und kodiert für ein 145 kD Protein, das der Kategorie der Typ-III Rezeptortyrosinkinasen zugeordnet wird. Diesen Proteinen ist eine extrazellulär gelegene, ligandenbindende, sowie eine hydrophobe Transmembranregion gemein. Dieser folgt eine intrazelluläre Domäne, die sich aus einer Region mit Tyrosinkinaseaktivität und einer autoinhibitorischen Region zusammensetzt. Hier wird ATP gebunden und eine Phosphatgruppe auf ein Substrat übertragen. Das extrazelluläre, N-Terminale Ende des Proteins besteht aus einer Signalsequenz, der fünf Immunglobulin-ähnliche (Ig-ähnliche) Motive folgen. Das zweite und dritte dieser Motive bilden nach einer Dimerisierung des Proteins die Ligandenbindungstasche; das vierte Ig-ähnliche Motiv spielt eine wichtige Rolle für die Dimerisierungseigenschaft des Rezeptors, die wiederum einen starken Einfluss auf die Affinität zu seinem Liganden hat. Der Ligand von c-kit konnte 1990 in dem stem cell factor (SCF), der auch als Mastzellen-Wachstumsfaktor bekannt ist,

identifiziert werden (Zsebo K et al. 1990 / Nocka K et al. 1990). Das Protein c-kit wurde primär in Progenitorzellen der Hämatopoese, dann auch in verschiedenen nicht-hämatopoietischen Geweben beschrieben (Miettinen et al. 2005). Insgesamt konnte – mit Ausnahme der Mastzellen – in Progenitorzellen mit ihrer Differenzierung ein Rückgang der c-kit-Expression festgestellt werden, was auf eine Rolle von c-kit in undifferenzierten Zellen hindeutet und ihn als möglichen Marker für Stamm- und Vorläuferzellen verschiedener Gewebe designiert. In der Zelle aktiviert c-kit über zytoplasmatische Kaskaden die MAP-Kinasen (mitogen-activated-protein-kinase), die u.a. ein wichtiges Signalmolekül für die Zellproliferation sind (Wandzioch E et al. 2004). Zudem verhindert es über den PI-3-Signalweg (s. Kapitel 1.2.3) die Apoptose (Engström M et al. 2003).

Während einzelne Mutationen in der Proteinstruktur zu einer konstitutionellen Aktivierung der Tyrosinkinase führen können und somit in der Entstehung von Neoplasmen beteiligt sind, spielen c-kit Proteine auf dem kardiovaskulären Gebiet eine hoffnungsvolle Rolle. Der Hypothese folgend, dass endogene Reparaturmechanismen des Myokards nach einem Myokardinfarkt existieren, wurden in infarktierten Herzen c-kit(+)-Zellen identifiziert, die ursprünglich aus dem Knochenmark stammten. Im Vergleich zu Sham-operierten Herzen war die Anzahl der c-kit(+)-Zellen erhöht. Mutationen im Protein verhinderten eine Migration der Zellen in das Myokard. Die Funktion der eingewanderten c-kit(+)-Zellen liegt wahrscheinlich in der Schaffung eines angiopoietischen Milieus in der Randzone des Infarktgebietes durch eine Steigerung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Fazel S et al. 2006). Ein kontroverser Punkt bleibt weiterhin, ob eine Transdifferenzierung von hämatopoietischen, c-kit(+)-Zellen zu Kardiomyozyten existiert, die zu einer endogenen Reparatur des Myokards führen könnte. Hierbei werden auch andere Mechanismen wie Zellfusion in betracht gezogen (Murry CE et al. 2004 / Nygren JM 2004). Schließlich wurde ein herznatives Kontingent an c-kit(+)-Zellen beschrieben, die pluripotente Eigenschaften besitzen; nach induziertem Myokardinfarkt differenzieren sie zu Zellen mit kontraktile Eigenschaften, die auch klassische Kardiomyozyten-Proteine exprimieren, in den ischämischen Defekt einwandern und verbessern die kardiale Leistung (Bearzi C et al. 2007).

1.4.2 sca-1

Das Oberflächenprotein sca-1 hat ein Molekulargewicht von 18 kD und ist über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker in der Zellmembran befestigt. Sein Gen gehört der Ly6A-Genfamilie (Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus A) an, die ursprünglich in Mäusen, später auch in Ratten identifiziert werden konnte (Bamezai A 2004). Im humanen

Genom konnten für Teile der Ly6A-Genfamilie *orthologe* Gene auf Chromosom 8 beschrieben werden, für *sca-1* jedoch gibt es kein direktes *Ortholog*. *Sca-1* vermittelt an der Zelloberfläche die Repression oder Konzentration verschiedener Zellsignale. Die genauen Signalmechanismen von *sca-1* bleiben jedoch noch unverstanden. Eine wichtige Rolle spielt *sca-1* in der Anreicherung von Stammzellen verschiedenster Gewebe. *Sca-1* findet sich ab E9 in der Embryonalentwicklung von Mäusen auf hämatopoietischen Stammzellen (de Bruijn et al. 2002), ist aber auch in Stamm- und Progenitorzellen sowie differenzierten Zellen anderer Gewebe zu finden, z.B. im Knochen der Mamma, der Prostata, dem Skelettmuskel, der Leber und dem Herzen zu finden (Holmes C et al. 2007). Im Herzen gehört *sca-1* neben *c-kit* und *MDR (Multi-Drug-Resistance)* zu den bisher beschriebenen charakteristischen Markern für im Herzen residierende Stamm- oder pluripotente Zellen. Es wurde berichtet, dass *sca-1(+)*-Zellen im Herzen nach Myokardinfarkt ebenfalls die Eigenschaft besitzen, zu Kardiomyozyten zu transdifferenzieren (Matsuura K et al. 2004).

1.4.3 GATA-4 und NOTCH-2

GATA-4

Das hoch konservierte Gen *GATA-4* kodiert für ein Mitglied einer Zinkfinger-Transkriptionsfaktorfamilie (*GATA-1* bis *GATA-6*), deren Mitglieder eine wichtige Rolle in der Morphogenese verschiedener Organe sowie der Differenzierung und des Wachstums ihrer Zellen spielen. *GATA*-Proteine besitzen zwei Zinkfingerdomänen, die an das *GATA*-Motiv binden, das in zahlreichen Genpromotoren präsent ist und steigern auf diese Art die Expression verschiedenster Gene. Während *GATA-1,2* und *3* in hämatopoietischen Zellen exprimiert werden, sind *GATA-4,5* und *6* in Geweben endo- und mesodermalen Ursprungs lokalisiert. *GATA-4* konnte in zahlreichen Vertebraten nachgewiesen werden und hat, mit *GATA-6*, eine eminente Bedeutung in der kardialen Morphogenese. Wird eine bestimmte Schwelle von *GATA-4* Genkopien unterschritten, unterbleibt die Aktivierung essentieller Gene für die frühe kardiale Entwicklung; *GATA-4* Nullmutationen führen zur abnormalen Faltung des Herzschlauches und zum frühen intrauterinen Tod (E 10,5) (Xin M et al. 2006 / Bisping E et al. 2006). Untersuchungen an Familien mit autosomal-dominanten kongenitalen kardialen Malformationen haben gezeigt, dass einzelne Mutationen im *GATA-4*-Gen zu fehlendem oder defektem Atrium- und Ventrikelseptum, hypoplastischem linken Ventrikel, Fallot-Tetralogie und Double-outlet-left-ventricle (DORV) führen können (Schluteran MK et al. 2007). Eine wichtige Rolle kommt *GATA-4* in der Funktion der Kardiomyozyten zu: in Mäusen mit einer um 70% reduzierten *GATA-4*-Expression fand sich hypoplastisches

Myokard und eine signifikant geringere Anzahl differenzierter Kardiomyozyten. Die Expression von GATA-4 variiert von der Embryonalzeit bis zum adulten Herzen beträchtlich, sie ist jedoch jederzeit nachweisbar. Möglicherweise kommt GATA-4 eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung von Herzhypertrophien zu (Bisping E et al. 2006). Insgesamt ist GATA-4 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ein wichtiger kardialer Marker, der während der gesamten kardialen Entwicklung und in adulten Herzen exprimiert wird; er unterstützt über ungeklärte Mechanismen die Differenzierung von Kardiomyozyten und leitet gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren die kardiale Entwicklung ein.

NOTCH-2

Die Funktionen von NOTCH-2 in Säugerorganismen sind komplex und vielfältig. Während der Entwicklung von Organen spielen Prozesse wie Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellproliferation eine entscheidende Rolle für eine physiologische Funktion und das Überleben des Organismus. Das NOTCH-System ist ein wichtiger Regulator dieser Prozesse und somit des Zellschicksals; Mutationen im NOTCH-Gen können daher zur Entstehung verschiedener Neoplasmen beitragen, wie der T-Zell akuten lymphatischen Leukämie, Mamma-Karzinom und Melanomen (Roy M et al. 2007). Ursprünglich in *Drosophila* entdeckt, konnten bei Vertebraten als Homolog hochkonservierte, 2500 Aminosäuren umfassende Transmembranrezeptoren des Typs 1, NOTCH-1 bis NOTCH-4 erkannt werden (Weinmaster G et al. 1991). Die Aktivierung des NOTCH-Rezeptors erfolgt über den Kontakt mit ligandenexprimierenden Zellen; zum jetzigen Zeitpunkt bekannte NOTCH-Liganden sind JAG1-2 sowie Delta1,3 und 4, die ebenfalls in der Zellmembran lokalisierte Proteine sind. Die extrazelluläre Domäne von NOTCH besteht aus 36 EGF-ähnlichen Wiederholungen (Epidermal-Growth-Factor). Die Bindung der Liganden vollzieht sich an den EGF-ähnlichen Domänen 11 und 12. In einem längs der Membran gelegenen Abschnitt befinden sich drei Lin12-NOTCH-Wiederholungen. Das c-terminale Ende des NOTCH-Proteins befindet sich im intrazellulären Raum und besteht aus einer so genannten RAM-Domäne, die im Nukleus mit Transkriptionsfaktoren interagieren kann, einer Protein-Protein-Interaktionsstelle (ANK), sowie sieben PEST-Sequenzen (reich an Prolin, Glutamin, Threonin und Serin), die Markierungen für proteolytische Enzyme sind und die schnelle Degradation des Proteins garantieren (Roy M et al. 2007). Wird NOTCH durch seine Liganden aktiviert, bewegt sich die durch zwei proteolytische Spaltungen freigesetzte intrazelluläre Domäne des Rezeptors (NICD) in den Nukleus und wirkt dort gemeinsam mit dem DNA-bindenden Proteinen CSL

(suppressor of hairless), MAML (mastermind-like), sowie weiteren Transkriptionskoaktivatoren als Transkriptionskomplex. Dieser ist verantwortlich für die Transkription verschiedener NOTCH-Zielgene (High FA et al. 2007 / Radtke F et al. 2005). Die Präsenz von NOTCH ist während der Entwicklung von Organen derart vielfältig, dass sich die Beschreibung seiner Funktionen an dieser Stelle auf seine Rolle in der kardialen Entwicklung beschränken sollen. Dass NOTCH-2 während der kardialen Entwicklung eine schwerwiegende Rolle spielt, wird am Beispiel des Alagille-Syndroms, das auf einer Haploinsuffizienz des NOTCH-Liganden Jagged-1 beruht, deutlich: kongenitale Herzfehler wie Fallot-Tetralogie, Defekte des Ventrikelseptums und der Aortenklappen sowie Stenosen der Pulmonalarterien sind charakteristische Merkmale, neben anderen multiple Organsysteme betreffende Defekte. Eine weitere wichtige Funktion nimmt NOTCH-2 bei der Differenzierung von Zellen der kardialen Neuralleiste während der Embryonalzeit zu glatten Muskelzellen ein; die Zellen der kardialen Neuralleiste spielen eine entscheidende Rolle während der Trennung des kardialen Ausflusstraktes in Aorta und Pulmonalarterie, während die differenzierten glatten Muskelzellen einen Teil der Muskelschicht der großen Arterien bilden (High FA et al. 2007). Zusammenfassend ist NOTCH ein Angelpunkt in der Entwicklung vieler Gewebe und spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung verschiedener kardialer Zelltypen.

1.4.4 c-myc und Tbx3

c-myc

Das Protoonkogen c-myc ist ein 46 kD messendes nukleares Phosphoprotein, das zur Klasse der sogenannten bHLH-ZIP-Proteine (basic-Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper (=Reisverschluss)) gehört. Der Leucin-Reisverschluss ermöglicht die Bildung eines Heterodimers mit dem Protein MAX (myc-associated-factor X), wodurch die Bindung von DNA, genauer, einer Konsensussequenz, der E-Box, erfolgt; hierdurch wird die Transkription bestimmter Gene aktiviert aber einiger weniger auch reprimiert.

Die Expression von c-myc steht in enger positiver Korrelation mit der Zellproliferation. Erhalten Zellen einen Stimulus zur Proliferation, steigt die intrazelluläre Anzahl von c-myc Proteinen, wogegen sie in differenzierten Zellen sinkt (Coller HA et al. 1999). Hypothesen, auf welche Art c-myc den Zellzyklus tatsächlich beeinflusst, sind zahlreich. Ein Schlüsselprotein ist hierbei Cyklin E, dessen Expressionsniveau unmittelbar vor dem Übergang von der G1 zur S-Phase ansteigt und dessen Aktivierung wahrscheinlich durch c-myc erfolgt. Zellen mit c-myc Nullmutationen weisen eine dreifach niedrigere

Proliferationsrate auf, als Wildtyp-Zellen. Zwar ist die Expression von c-myc keine Bedingung für das Überleben der Zelle, wohl aber für ihr Wachstum. Charakteristisch für c-myc $-/-$ Zellen sind eine verringerte und verlangsamte Aktivierung von Cyclin E und längere G1 und G2 Phasen (Obaya AJ et al. 1999). Als Konsequenz dieser Schlüsselrolle im Zellwachstum ist c-myc seit zwei Jahrzehnten zum wichtigen onkologischen Forschungsgegenstand avanciert. Die Menge dieses Proteins unterliegt in normalen Zellen einer genauen Kontrolle, während sich in maligne transformierten Zellen häufig eine Amplifikation oder Überexpression von c-myc findet. Über eine Hemmung des P13/Akt Überlebenssignalwegs trägt c-myc auch zur typischen erhöhten Apoptoseneigung von Tumorzellen bei. Interessanterweise spielt c-myc ebenfalls eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Vorgängen des kardiovaskulären Systems, wie z.B. in der Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäße (VSMC) nach Gefäßverletzungen und der Atherosklerose (Bellmann K et al. 2006).

Tbx3

Das Gen Tbx3 kodiert für ein Protein, das Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren ist. Diese setzt sich aus 18 inzwischen bei Vertebraten entdeckten Tbox-Genen zusammen, die eine gemeinsame, hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne - die Tbox - besitzen. 1990 in Mäusen entdeckt, werden den Tbox-Genen inzwischen zahlreiche regulatorische und repressive Funktionen während der Entwicklung verschiedener Organsysteme zugeschrieben. Mutationen in Genen der Tbox-Familie führen zu Störungen der Entwicklung der Extremitäten, zu fehlerhaften Anlagen der Haare, Zähne, des Genitaltraktes und sind möglicherweise auch an der Entstehung des DiGeorge-Syndroms beteiligt. Spezifische Mutationen im Tbx3-Gen verursachen das seltene Ulna-Mamma-Syndrom, sowie auch das Holt-Oram-Syndrom, das mit kongenitalen Herzfehlern einhergeht (Platonova N et al. 2006). T-box-Gene werden in der embryonalen Herzentwicklung ab E8 exprimiert, bei Vertebraten sind dies besonders Tbx2, Tbx3, Tbx5 und Tbx20. Beteiligt sind sie an der Entwicklung des Reizleitungssystems, der Klappenentstehung, sowie der Morphologie der Kammern. Je nach Gen sind die Eigenschaften ihrer Genprodukte, also der Transkriptionsfaktoren hemmend oder aktivierend auf die Transkription ihrer Zielgene. Tbx2 und Tbx3 besitzen beide jedoch sowohl transkriptionshemmende Domänen an ihren N- und C-terminalen Enden, als auch aktivierende Domänen. Dies weist darauf hin, dass sie als Modulatoren der Herzentwicklung ihre Rolle in mehreren molekularen Kontexten erfüllen (Yamada M et al. 2000 / Hoogaars W et al. 2004 / Plageman TF et al. 2004).

Unter den verschiedenen Tbox-Transkriptionsfaktoren nimmt Tbx3 eine besondere Rolle ein; während Tbx5 gemeinsam mit Nkx2.5, einem anderen Transkriptionsfaktor, vor allem die frühe kardiale Determinierung verschiedener Vorläuferzellen unterstützt, reprimiert Tbx3 über eine Hemmung von Cx40 (connexin40) und Nppa (natriuretic precursor peptide A) diesen Prozess der Differenzierung in bestimmten Arealen und trägt hierdurch zur Entstehung der Herzhöhlen sowie des Reizleitungssystems bei (Hoogaars W et al. 2004).

1.4.5 STAT-3 und Akt

STAT-3

Die STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription) sind intrazelluläre Effektormoleküle verschiedener Zytokine wie Interferon $\alpha/\beta/\gamma$ (IFN), Tumornekrosefaktor α und Interleukinen. STAT-Proteine kommen in vielen Zelltypen vor und regulieren als Antwort auf Zytokinstimulation der Zelle ein breites Spektrum von Genen, die das Zellüberleben unterstützen und immunologische Prozesse modulieren (Yin W et al. 2006). Ihre Aktivierung erfolgt über mehrere Schritte: bindet ein Zytokin an einen Klasse - I - Zytokinrezeptor, werden intrazelluläre Tyrosinkinasen der Janusfamilie (JAK1-3) aktiviert, die wiederum STAT-Proteine durch Phosphorylierung zur Formung von Homo- und Heterodimeren anregen. Die STAT-Moleküle wandern in dieser Form in den Nukleus, fungieren als Transkriptionsfaktoren und binden eine als GAS (IFN γ - activated site) bezeichnete Konsensussequenz der DNA. Es existieren sieben verschiedene Isoformen von STAT-Proteinen, die durch alternatives Spleißen entstehen (Heinrich PC et al. 2003: Biochemie und Pathobiochemie). Die STAT-Proteine spielen verschiedene Rollen in Prozessen wie Apoptose und Zellwachstum. Hierbei kommt STAT-3 eine besondere Stellung zu, da nur seine Aktivierung das embryonale Überleben bedingt. Sind andere Mitglieder der STAT-Familie ausgeschaltet, z.B. durch Gen Targeting, resultieren spezifische Immundefekte, jedoch gibt es keinen Einfluss auf die Letalität. In STAT-3 defizienten Mäuseembryonen, beginnen zwischen E6.5 und E8.5 degenerative Prozesse mit 100% Letalität, die STAT-3 eine Schlüsselrolle während der frühen embryonalen Entwicklung zuweisen (O'Shea JJ et al. 1997). In embryonalen Stammzellen ist die Aktivierung von STAT-3 über den Rezeptor gp130 genügend, um ein undifferenziertes Proliferationsstadium zu erhalten. Gleichzeitig gehen Zellen mit defektem STAT-3 Protein nach wenigen Tagen zugrunde. Verschiedene Arbeiten haben zeigen können, dass STAT-3 zudem eine wichtige Position in der Hemmung der Apoptose einnimmt. Eines der Zielgene des STAT-3-Transkriptionsfaktors ist bcl-2, das als antiapoptotischer gilt und über dessen Funktion STAT-

3 möglicherweise seine positiven Effekte auf das Zellüberleben entfaltet (Fukada et al. 1996 / O'Shea JJ et al. 1997).

Akt

Die Serin-Threonin-Protein-Kinase Akt spielt u.a. eine Schlüsselrolle in den antiapoptotischen Signalwegen der Zelle. So können Moleküle wie z.B. Östrogene über schnelle, nongenomische Aktivierung von Akt verschiedene Komponenten der zellulären Apoptose-Mechanismen phosphorylieren und damit hemmen. Die drei Isoformen von Akt sind in allen Säugerzellen präsent. Die Aktivierung erfolgt durch eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren (z.B. Insulinrezeptor, Insulin-Growth-Factor-Rezeptor), die Akt eine Rolle als wichtiges Bindeglied verschiedenster Signalwege des Glucose-Metabolismus, der Gentranskription, der Proteinsynthese, sowie des Zellüberlebens zuschreiben. Bei Bindung und Aktivierung durch einen Liganden, wird über das Enzym Phosphatidylinositol-3-Kinase (PDK-1) Akt phosphoryliert und damit zu seiner aktivierten Form Phospho-Akt überführt. Akt inhibiert die Apoptose in der Zelle über mehrere Wege: es phosphoryliert die Bad-Komponente des Bad/Bcl-Komplexes und verursacht damit die Dissoziation des Komplexes... Phospho-Akt gelangt zudem in aktivierter Form in den Nukleus und aktiviert dort IKK- α (I-kappa-B kinase alpha), und NF- κ B (nuclear factor-kappa B), welches wiederum als Transkriptionsfaktor Gene des Zellüberlebens aktiviert (Gnecchi M et al. 2006). Im Nukleus phosphoryliert Phospho-Akt einen proapoptotischen Transkriptionsfaktor, Forkhead, der daraufhin in das Zytoplasma transloziert und damit die Transkription proapoptotischer Genprodukte inhibiert (Camber-Kirby D et al. 2001). Es gibt Hinweise, dass Akt auf parakrinem Weg Überlebenssignale an andere Zellen vermittelt. In mesenchymalen Stammzellen, in denen Akt überexprimiert wird, werden Zielgene von Akt, die für parakrine Botenstoffe kodieren, ebenfalls verstärkt transkribiert (VEGF, FGF-2, IGF-1 und TB4) und erhöhen das Überleben von Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt (Mirotsov M et al. 2007). In Kardiomyozyten konnte nach einer Ischämieperiode von 18 Stunden durch 17- β -Östradiol Stimulation hervorgerufene erhöhte Konzentrationen von Akt und Phospho-Akt gemessen werden. Interessanterweise konnte in weiblichem Myokard aus Mäuseherzen im Vergleich zu männlichen Mäusen ebenfalls erhöhte Proteinkonzentrationen von Phospho-Akt bestimmt werden, was ein möglicher Mechanismus Östrogen-vermittelter Kardioprotektion sein könnte (Camber-Kirby D et al. 2001 / Kim JK et al. 2006).

1.5 Kardiale Stammzellen

Während der letzten 60 Jahre hat sich die wissenschaftliche Perspektive auf das Herz als terminal differenziertes Organ geändert. Ein neues Paradigma, das dem Herzen regenerative Funktionen zuschreibt, entstand. Es stützt sich auf verschiedene Beobachtungen: zunächst konnte gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen unter bestimmten Kulturbedingungen in Kardiomyozyten differenzieren (Xu C et al. 2002). Aber auch adulte Stammzellenpopulationen wurden in verschiedenen Geweben, wie dem Gehirn, dem Skelettmuskel und dem Myokard beschrieben, die die Hypothese der Selbsterneuerung eines Organs –unter pathologischen und physiologischen Bedingungen- durch ein Kontingent organeigener Stammzellen zur Möglichkeit werden ließ. Auch die Theorie, nach der eine „Transdifferenzierung“ adulter Stammzellen in differenzierte Zellen eines anderen Gewebes stattfinden kann wurde vielfach untersucht. Im kardiovaskulären System konnte gezeigt werden, dass humane mesenchymale Stammzellen (HMSC), die aus dem Knochenmark isoliert werden können, in Endothelzellen transdifferenzieren (Jackson KA et al. 2001). Kontrovers bleibt, ob HMSC auch in Kardiomyozyten differenzieren (Toma C et al. 2002 / Murry CE et al. 2005).

Mit Stammzellen des Skelettmuskels sowie HMSC wurden eine Reihe klinischer Studien zum Versuch der Regeneration des Myokards nach Myokardinfarkt initiiert. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass implantierte Myoblasten des Skelettmuskels im Infarktgewebe zu multinukleären tubulären Strukturen differenzierten, die jedoch keine Eigenschaften von Kardiomyozyten aufwiesen, und mit den vorhandenen Kardiomyozyten keine Gap-Junctions und somit kein funktionelles Synzytium zu bilden vermochten. Die kardiale Funktion zeigte jedoch eine funktionelle Verbesserung des linken Ventrikels. Die Infusion von HMSC während oder nach Myokardinfarkt zeigte in der „BOOST“-Studie eine Erhöhung der Ejektionsfraktion (EF) des linken Ventrikels um 6% im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Wollert KC et al. 2004); Chen et al. konnten nach Gabe von HMSC eine Erhöhung der EF um 14% verzeichnen, sowie eine Erhöhung der Glucose-Aufnahme in Kardiomyozyten und eine Verbesserung der Ventrikelmotilität. Eine Transdifferenzierung der HMSC konnte nicht gezeigt werden (Murry CE et al. 2005).

Ein möglicher kardialer Regenerationsmechanismus bleiben die im Herzen residierenden Stammzellen. Bis zur Entdeckung dieser Population wurden mitogene Aktivitäten der Kardiomyozyten als nichtig betrachtet. Kardiomyozyten konnten Hypertrophierungsprozessen unterliegen, jedoch nicht proliferieren (Urbanek K et al. 2006 / Anversa P et al. 2006). Diese als kardiale Stammzellen Zellen, die Nischen im Myokardgewebe bilden, exprimieren die

Stammzellmarker c-kit, sca-1 und islet-1 (Beltrami AP et al. 2003 / Oh H et al. 2003 / Laugwitz KL et al. 2005), wobei unterschiedliche Subpopulationen zu existieren scheinen, von denen manche nur einen, manche aber auch zwei Marker exprimieren. Das Modell der Proliferation kardialer Stammzellen, wie von Anversa P et al. 2006 beschrieben, erfolgt durch symmetrische und asymmetrische Teilung. Es entstehen Tochterzellen, die Progenitorzellen für Kardiomyozyten sind. Bereits die erste Generation exprimiert sowohl Stammzellmarker als auch Transkriptionsfaktoren die typisch für Kardiomyozyten sind (GATA-4, NKX2.5 und MEF2C) (Anversa P et al. 2006).

In einem tierexperimentellen Ansatz, die regenerativen Fähigkeiten kardialer Stammzellen nach Myokardischämie zu untersuchen, wurden keine Zellen infundiert, sondern die Randzone des Infarktes mit HGF und IGF-1 stimuliert. Acht Stunden nach dem Infarkt konnte die 11-fache Menge kardialer Stammzellen verglichen mit nicht-stimulierten Herzen im Randgebiet des Infarktes gefunden werden. Ebenso war die Ventrikelkontraktilität der behandelten Tiere nach vier Wochen im Vergleich zu unbehandelten Tieren mit Infarkt deutlich gesteigert. Die *de Novo* Synthese von Kardiomyozyten wurde in behandelten, aber nicht in unbehandelten Herzen beschrieben (Linke A et al. 2005).

Beide Östrogenrezeptoren sind in die kardialen stammzellvermittelten Regenerationsmechanismen impliziert; ihnen wird eine Rolle in der Mobilisation von Progenitor Zellen des Knochenmarks zugeschrieben, welche zur funktionellen Verbesserung der Myokardarbeit beitragen (Hamada et al. 2006).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die kürzlich entstandene Theorie der kardialen Protektion über parakrine Vermittlung durch Einwanderung von Stammzellen in das Ischämiegebiet. Darauf soll in der Diskussion genauer eingegangen werden.

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

„Schlagen Frauenherzen anders?“ Solche momentan sehr beachteten Artikel (Regitz-Zagrosek V et al. 2006) machen deutlich, dass nicht nur in der wissenschaftlichen Presse, sondern auch im öffentlichen Bewusstsein die Notwendigkeit einer „bilateralen Medizin“ deutlich wird.

Dass der weibliche Organismus über andere Schutzmechanismen verfügt, als der männliche, ist hinlänglich bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass im Kontext kardiovaskulärer Ereignisse die Gabe von Östrogenen im männlichen Organismus ähnlich protektiv wirken kann, wie im weiblichen Organismus. In dieser Arbeit wurden daher bewusst männliche Tiere gewählt.

Diese Arbeit soll sich mit der Frage beschäftigen, einen Mechanismus zu beschreiben, der möglicherweise dazu beiträgt, dass östrogensubstituierte Frauen nach Erleiden eines Myokardinfarktes eine bessere kardiale Funktion beibehalten, als Männer insgesamt und als Frauen ohne hormonelle Substitution. Sie postuliert, dass im Herzen residierende oder aus anderen Organen emigrierte c-kit(+)-Zellen hierbei eine wichtige Rolle spielen.

Aufgrund des kürzlich beschriebenen kardioprotektiven Effekts von E2 durch Mobilisation von progenitor Zellen des Knochenmarks (Bone-Marrow derived progenitor cells) (Hamada et al. 2006), wäre eine Regulation der c-kit(+)-Zellen durch E2 und seine Rezeptoren ebenfalls möglich (s. Kapitel 1.5). Daher wurde in dieser Arbeit die Expression der Östrogenrezeptoren in c-kit(+)-Zellen sowie ihre funktionelle Relevanz im AMI untersucht. Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit besteht daher in dem Versuch einer Charakterisierung der isolierten c-kit(+)-Zellen. Existiert die Expression der Östrogenrezeptoren in den sieben Tage nach Myokardinfarkt aus dem Herzen isolierten Vorläuferzellen, so ist eine Rolle in der durch Östrogene induzierten Kardioprotektion denkbar. Letztlich soll der Frage nachgegangen werden, ob Östrogene *in vitro* mittels c-kit(+)-Zellen einen Einfluss auf Kardiomyozyten ausüben.

In diesem Kontext wird durch ein Modell an einer Zelllinie von embryonischen Kardiomyoblasten (H9c2) die Wirkung von E2, den respektiven Agonisten seiner Rezeptoren und seinem unspezifischen Antagonisten ICI auf Genprodukte der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Differenzierung untersucht. Hier handelt es sich um GATA-4, Tbx3, NOTCH-2, Akt, STAT-3 und c-myc, die speziell in der kardialen Entwicklung oder allgemein im Zellzyklus besondere Bedeutung haben. Die Auswahl des Modells begründet sich auf der Hypothese, dass H9c2-Kardiomyoblasten näherungsweise eine „Brücke“ zwischen den undifferenzierten c-kit(+)-Zellen und den reifen Kardiomyozyten bilden können; sie exprimieren die oben genannten Marker und können Anhaltspunkte liefern, inwiefern Östrogene im Herzen un- oder gering differenzierte Zellen beeinflussen. Die hier gewonnenen Informationen, nicht zuletzt über die anzuwendenden Substanzkonzentrationen waren wertvoll für die Arbeit mit den c-kit(+)-Zellen.

Es soll in dieser Arbeit also versucht werden, einen der wahrscheinlich zahlreichen Mechanismen der Östrogen-vermittelten Kardioprotektion nach Myokardinfarkt zu untersuchen.

2 Material und Methoden:

2.1 Material:

2.1.1 Versuchstiere und Zelllinien

Rattus norvegicus, Stamm: HsdCpb: WU

Männliche Wistar-Ratten (175-199 g)

Harlan Winkelmann GmbH,

Borchen, D

Rattus norvegicus, Zelllinie:

American Type Culture Collection,

H9c2 - Kardiomyoblasten

Manassas, USA

2.1.2 Narkotika und applizierte Substanzen

Xylazin/Ketamin

Sigma, Taufkirchen, D

BrdU

Sigma, Taufkirchen, D

2.1.3 Medien und Stimulanzien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Dulbecco's (DMEM)

PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D

Dulbecco's (DMEM-F12)

PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D

(w/o Ca²⁺, Mg²⁺)

Trypsin/ EDTA (0,25%/0,5 mM w/v)

PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D

(für Zellkultur)

Hanks' Salzlösung (HBSS)

Sigma, Taufkirchen, D

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma, Taufkirchen, D

Fötale Kälberserum (FBS)

Invitrogen Life Technologies,

Karlsruhe, D

Penicillin-Streptomycin (100 U/mL Penicillin,

100 µg/mL Streptomycin) (P/S)

PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D

17-β-Östradiol - Wasserlöslich

SIGMA, Taufkirchen, D

2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin

SIGMA, Taufkirchen, D

ICI 182,780

TOCRIS Ltd. Avonmouth, GB

PPT

TOCRIS Ltd. Avonmouth, GB

DPN

TOCRIS Ltd. Avonmouth, GB

2.1.4 Puffer und Lösungen

Zellisolation

MACS-Working-Solution

1x

PBS

2,5%

BSA

2mM

EDTA

Percoll® Amersham Biosciences, Freiburg, D

Proteingewinnung

Trizol

Invitrogen

Proteinlysepuffer:

2 g Sucrose
8 ml 25% SDS
2,4 mL 1M Tris Hcl pH 6,8
96 ml H₂O

Western Blot Lösungen

1x Elektrophoresepuffer:

3 g Tris-Base
14,4 g Glycin
1 g SDS
ad 1 L H₂O

Nass –Blotpuffer (Towbin):

3,03 g Tris-Base
14,4 g Glycin
200 mL Methanol
5 ml 10% SDS
ad 1 L H₂O
pH-Wert 9,0 – 9,4

10x Tris-buffered saline (TBS):

24,2 g Tris-Base
80 g NaCl
ad 1 L H₂O
pH-Wert 7,5

1x TBS-T:

100 mL 10x TBS
1 mL Tween 20
ad 1 L H₂O

Coomassiestammlösung

1 g Coomassie Blue
Add 100 ml Aqua dest.

Coomassie Working Solution

31,25 ml Stammlösung
125 ml Methanol
25 ml Essigsäure

2.1.5 Kits

BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Perbio Science, Piece, Bonn, D
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham-Pharmacia, Freiburg, D
Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit	LINARIS GmbH, Wertheim, D
Fluorescein FragEL DNA Fragmentation Detection Kit (TUNEL)	Calbiochem, Darmstadt, D

2.1.6 Nukleinsäuren und Nukleotide

TaqMan® (Real-Time PCR-Mix)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, D

Nukleotide

dNTP Set	Sigma, Taufkirchen, D; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D; Promega GmbH, Mannheim, D
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D

Real-time PCR-Mastermix

„Stammkomponente“	Zusammensetzung der „Stammkomponente“	µl pro Ansatz bei 25 µl Gesamtansatz
H ₂ O		7,1
Taq Man		12,5
Forward Primer	20 µM	0,2
Reverse Primer	20 µM	0,2
cDNA		5
Gesamt		25

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR-Mastermix

Primer

Alle Primer wurden mit dem Programm Primer3 unter <https://biotools.umassmed.edu> entworfen, basierend auf Sequenzdaten des entsprechenden Organismus unter www.ensembl.org bzw. www.pubmed.gov. Dabei wurden die Primersequenzen so gewählt, dass diese eine Exon-Exon-Grenze des Zielgens überspannten und dadurch sichergestellt wurde, dass es sich bei dem späteren Amplifikat ausschließlich um mRNA handelt. Beide Primer blastete man jeweils gegen das gesamte Organismusgenom unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> und überprüfte auf die Amplifikation unerwünschter Fragmente. Alle Primer wurden von TIB Molbiol GmbH, Berlin, D, bezogen.

Gen	Sequenz
ER alpha Forward	5'-TgCCTCTggCTACCATTATgg-3'
ER alpha Reverse	5'-TATgTCCTTgAATgCTTCTCTTAAAgAA-3'
ER alpha Sonde	5'-TggTCCTgTgAAggCTgCAAggC-3'
ER beta Forward	5'-TgAgCAAAGCCAAgAgAAACg-3'
ER beta Reverse	5'-CCAgTTgCTCTggACTCAAaggT-3'
ER beta Sonde	5'-TgCACCCCgggTgAAggAgCTAC-3'
GATA-4 Forward	5'-CTTgAgCAAACCgAgCCTAAAg-3'
GATA-4 Reverse	5'-ggCCCAACTCgCTCAAAA-3'
GATA-4 Sonde	5'-TgTTgCTCTgATgCTggATTTAAT-3'
NOTCH-2 Forward	5'-CCACAACggCACAggCTACT-3'
NOTCH-2 Reverse	5'-ACAaggTCTCgATgTTgACAA-3'
NOTCH-2 Sonde	5'-CgATgTCCAgAgggCTTCTTgggAgA-3'
Tbx3 Forward	5'- AgTACCTTCCgCACATACCTgTTC-3'
Tbx3 Reverse	5'-TgTCTATTTTTAACTgggTTATCTTgTCA-3'
Tbx3 Sonde	5'- CggAAACAgAATTCATCgCCgT-3'
c-myc Forward	5'-ggTggAAAACCCgACAgTCA-3'
c-myc Reverse	5'-ACCgAgTCgTAgTCgAggTCAT-3'
c-myc Sonde	5'-CCCTCAACgTgAgCTTCgCTAACAgg-3'
Akt Forward	5'-TCAACA ACTTCTC AgTggCACAA-3'
Akt Reverse	5'-ggC AgCggATgATgAAggT-3'
Akt Sonde	5'-AgCTgATgAAgACAgAgCggCCgA-3'
STAT-3 Forward	5'-gCgATAgCTTCCCCATggA-3'
STAT-3 Reverse	5'-gCgATAgCTTCCCCATggA-3'
STAT-3 Sonde	5'-TTCCTggCgCCTTggATTgAgAgC-3'
b-actin Forward	5'-ATCgCTgACAggATgCAgAAg-3'
b-actin Reverse	5'-CgCTC AggAggAgCAATgAT-3'
b-actin Sonde	5'-AgATTACTgCCCTggCTCCTAgCACCA-3'

Tabelle. 2: Verzeichnis der verwendeten Primer. (Real-Time-PCR)

2.1.7 Reverse Transkription und Verdauungsenzyme

M-MLV RT RNase H Minus (200 U/ μ L)	Promega GmbH, Mannheim, D
Superscript-II-Reverse Transcriptase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
RNasin (40 U/ μ L)	Promega GmbH, Mannheim, D
Taq-Polymerase (5 U/ μ L)	Promega GmbH, Mannheim, D
Trypsin (für Zellisolation)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
(Trypsin – Inhibitor)	Worthington, St. Katharinen, D
Collagenase	SIGMA, Taufkirchen, D

2.1.8 Antikörper

Die Antikörperverdünnungen wurden wie unten aufgeführt in den Experimenten genutzt.

Erstantikörper	Verdünnung	
c-kit anti-rat IgG (Kaninchen)	(1:100)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
sca-1 IgG anti-rat (Maus)	(1:20)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D
ER α (Kaninchen)	(1:100)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
ER β (Ziege)	(1:100)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti-BrdU (Maus)	(1:100000)	SIGMA, Taufkirchen, D
α -sarcomeric actin (Maus)	(1:250)	SIGMA, Taufkirchen, D

Fluoreszenz - und FACS - Antikörper

FITC IgG (Maus)/(Kaninchen)	(1:150)	Dianova, Hamburg, D
Cy3 IgG (Ziege)/(Kaninchen)	(1:200)	Dianova, Hamburg, D
Cy3 IgM (Maus)	(1:200)	Dianova, Hamburg, D
AMCA IgM (Maus)	(1:150)	Dianova, Hamburg,
PE-anti-rabbit IgG (goat)	(1:25)	Dianova, Hamburg, D
Dapi Nucleic Acid Stain	(1:1000000)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Calcein		Invitrogen, Karlsruhe, D
Mounting Medium für Schnitte		Dako, Glostrup, Dänemark

MACS - Analyse

Anti-PE IgG1 Micro Beads (Maus)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
---------------------------------	--

2.1.9 Ausgewählte Geräte

Zentrifugen/ Rotoren

Tischzentrifugen Mikro 20, Typ2004
Galaxy Mini
Zentrifuge 5415R
Kühlzentrifuge Mikro 22R

Hettich, Zentrifugen, Tuttlingen, D
Merck KGaA, Darmstadt, D
Eppendorf, Hamburg, D
Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

Mikroskop

Lichtmikroskop Leica DMIL

Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRE2

Konfokales Mikroskop

Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt
a.M., D
Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt
a.M., D
Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt
a.M., D

Filmmaterial

Hyperfilm™ ECL

Amersham-Pharmacia, Freiburg, D

MACS Analyse

MACS Separation Unit™
MACS Pre- Separation Filter
MS Columns

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D

FACS Analyse

FACSDiva™

BD Biosciences, Erembodegem, BG

Kleintierbeatmungsgerät

Starling Ideal Ventilator

Harvard Apparatus

Doppler

VisualSonics 770

Operationszubehör

0,6 Faden, steril
Diverse Scheren und Pinzetten

Ethicon, Norderstedt, D
Becton Dickenson, Sparks, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere: Haltung und Behandlung

Die Isolation von Primärzellen und die Gewinnung von Gewebe erfolgte ausschließlich aus Herzen von männlichen, normotensiven Ratten der Zuchtlinie Wistar. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Operation betrug sechs Wochen, ihr Gewicht lag bei 250 Gramm. Der Ort der Unterbringung und Operation war der Tierstall des Centers for Cardiovascular Research, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Die Tiere waren ausserhalb der Versuchszeiten in 26x42 cm großen Macrolon-Einzelkäfigen untergebracht und hatten freien Zugang zu einer Standarddiät (Altromin®, Altromin GmbH u. Co. Kg.) und Trinkwasser. Bei einer konstanten Temperatur von 24 °C im Tierstall und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% unterlagen die Tiere einem 12-stündigen circadianen Rhythmus.

Die Behandlung und Haltung der Tiere erfolgte gemäß §9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes (G 0064/07).

2.2.1.1 Applikation von BrdU

Zur Detektion neu gebildeter Zellen im Periinfarktgebiet wurde zur das Thymidin-Analogon BrdU appliziert. Die Behandlung der Tiere erfolgte an den Tagen zwei, vier, und sechs post infarctionem. Die Dosis wurde gemäß dem Standardprotokoll auf 30mg/kg festgelegt und i.p. appliziert.

2.2.2 Chirurgische Eingriffe

2.2.2.1 Narkosen

Die nachfolgend erläuterte Narkoseform wurde in der Sham - Gruppe und der AMI - Gruppe in gleicher Weise während der Myokardinfarktinduktion vorgenommen. Die Narkose wurde intraperitoneal mit Ketamin-Xylazin (80mg/10 mg/kg i.p.) appliziert. Die anschließende Beatmung und Intubation erfolgte über ein Beatmungsgerät für Kleintiere.

Vor der Isolation der Herzen wurde bei beiden Versuchsgruppen eine 4% - Chloralhydratlösung in einer Dosierung (10 ml/kg) intraperitoneal injiziert. Nach einer Wartezeit von ca. 10 min. stellte sich eine tiefe Bewusstlosigkeit ein, die durch eine fehlende Reaktion auf Schmerzreize, z.B. durch einen Kniff in die Schwanzspitze, überprüft werden konnte.

2.2.2.2 Myokardinfarktinduktion und Sham-Operation

Die von Johns und Olsen 1954 beschriebene Ligation der LAD zur Myokardinfarktinduktion wurde für diese Arbeit nach der 1979 von Pfeffer modifizierten Methode angewandt.

Nach Induktion der Narkose (siehe 2.2.2.1) und einer zehnminütigen Wartezeit zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde nach Fixierung in Rückenlage auf dem Operationsbrett die linke Thoraxhälfte rasiert und desinfiziert. Eine orotracheale Intubation erfolgte vorab, da bei Eröffnung der Thoraxhöhle eine Beatmungspflichtigkeit entstand; der Tubus wurde an ein Beatmungsgerät für Kleintiere angeschlossen so dass das Atemzugvolumen des Tieres aus 0,6 – 0,7 ml bei einer Frequenz von 50/min bestand.

Die Operation wurde durch eine 2 cm lange Hautinzision zwischen der dritten und vierten Rippe begonnen, woraufhin das Unterhautfettgewebe mobilisiert und die Pectoralismuskulatur zur Seite verlagert werden konnte. Die Eröffnung des Thorax folgte nach vorsichtiger Durchtrennung der Intercostalmuskulatur durch ein Skalpell mit einem Rippenspreizer, der in den Zwischenrippenraum eingeführt und dann langsam gespreizt wurde. Nach vorsichtiger Eröffnung des Perikards wurde die LAD mit dem Operationsmikroskop aufgesucht und ca. 2mm nach ihrem Abgang mit sterilem 0-6 Faden ligiert. Zwar konnte subjektiv eine eintretende Ischämie durch Abblassung des Gewebes im weiteren Stromgebiet der Koronararterie beobachtet werden, eine objektivierbare Messung erfolgte jedoch erst 24 Stunden nach der Infarktinduktion durch einen transthorakalen Doppler anhand dessen die Präsenz und das Volumen des Infarktes genauer beurteilt wurden. Nach Entnahme des Rippenspreizers wurde die Pectoralismuskulatur bei gehaltener Inspiration durch zwei Einzelknopfnähte genäht und ein luftdichter Verschluss durch Histoacryl-Gewebekleber geschaffn. Nach abschließender Hautnaht wurden die Tiere extubiert und bis zu ihrem Erwachen ca. 20 Minuten nach Beendigung der Operation überwacht.

2.2.2.3 Isolation der Herzen

Sieben Tage nach Induktion des Myokardinfarktes wurden die Herzen zur Gewinnung von Gewebe und Isolation von c-kit(+)- Zellen entnommen. Hierzu wurden die Tiere wie unter 2.2.2.1 beschrieben mit 4% - Chloralhydratlösung i.p. tief narkotisiert; nach abermaliger Eröffnung des Thorax wurden die Herzen zunächst mit PBS perfundiert um Thrombenbildung zu vermeiden und für die spätere Zellisolation möglichst viele Blutzellen aus dem Herzen zu eliminieren. Kurz nach Abgang der großen Gefäße wurden die Herzen schließlich abgetrennt, entnommen und umgehend in steriles Kalzium- und Magnesium- freies HBSS aufgenommen.

2.2.3 Isolation von c-kit(+)-Zellen und Kardiomyozyten

2.2.3.1 Enzymatischer Verdau

Die isolierten Herzen wurden unter der Sterilbank mithilfe eines Skalpell und einer sterilen Pinzette in einer mit 5 Milliliter HBSS gefüllten Petrischale in 1mm Gewebestücke zerkleinert. Daraufhin wurde das Gewebe bei 4°C über Nacht mit 500µl Trypsin in einer Konzentration von 100µg/ml verdaut. Die Aktivität des Trypsins wurde mit 500µl Trypsinhibitor [conc: 200µg/µl] antagonisiert und anschließend durch einen weiteren Gewebeverdau mit 200µl Kollagenase in einer Konzentration von 100U/ml und einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C abgeschlossen. Alle Enzyme wurden in HBSS und PBS gelöst.

2.2.3.2 Herstellung einer Zellsuspension

Das Gewebe wurde im nächsten Schritt mit einer Pipette resuspendiert und eine Zellsuspension durch verschiedene Filtrervorgänge hergestellt: zur Separation von größeren Geweberesten wurde die Suspension über ein Sieb mit 70µm Porengröße gegeben. Ein Teil (1,5 Milliliter) wurde zur Isolation von Kardiomyozyten abgezweigt und die restliche Zellsuspension durch ein 30µm Sieb filtriert. Beide Lösungen wurden anschließend für 10 Minuten bei RT zentrifugiert (Kardiomyozyten: 950 rpm / Lösung für c-kit(+)-Zellen: 1650 rpm) und das überschüssige Medium über dem Zellpellet abgesaugt.

2.2.3.3 Zelltrennung durch Percoll®

Die Zellen wurden nach ihrer Größe und Dichte mit einem aus Percoll bestehendem Dichtegradienten aufgetrennt. Percoll® besteht aus Silikagelpartikeln die mit PVP beschichtet sind. Osmolarität und pH sind auf Versuche mit Zellen und Zellpartikeln abgestimmt. Es wurden drei Konzentrationen für einen dreistufigen Dichtegradienten ausgewählt, (s. Abbildung 1.1) das Zellpelett in die 30% ige Phase aufgenommen und vorsichtig über die beiden unteren Phasen gegeben. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 2100 rpm stellte sich folgende Auftrennung der Zellen dar: die unterste Schicht bestand vor allem aus Erythrozyten, unmittelbar darüber befand sich als „white coat“ eine Lage, die vornehmlich aus Leukozyten bestand. Die mittleren Lagen enthielten vornehmlich Kardiomyozyten nach ihrer Größe aufgetrennt, in der höchsten Lage befanden sich tote Zellen sowie Gewebedébris. Die Kardiomyozyten wurden separat abgenommen und daraufhin das über den Erythrozyten liegende „white coat“ in ein anderes Gefäß in 2 Milliliter MACS-Working-Solution (MWS,

siehe Kapitel 2.1.3) überführt. Sowohl Kardiomyozyten als auch die c-kit(+)-Zellen enthaltende „white coat“ wurden in PBS bzw. MWS gewaschen, die Kardiomyozyten ausplattiert (5000/Well) und die Leukozytensuspension zur Behandlung mit Antikörpern für MACS und FACS Analyse in 500µl MWS aufgenommen.

2.2.3.4 MACS-Analyse

Die MACS-Analyse bietet als Methode die Möglichkeit zur positiven oder negativen Selektion bestimmter Zellfraktionen durch Markierung mit kleinsten Metallpartikeln, die an einen Zweitantikörper gekoppelt sind. Diese binden an einen Erstantikörper, der als Zielstruktur ein die gesuchte Zelle charakterisierendes Protein, z.B. einen Rezeptor hat. Die Zellen passieren nach der Antikörperbehandlung ein magnetisches Feld, in dem eine Retention der markierten Zellen erfolgt. Diese können dann z.B. in Kultur genommen oder einer weiteren Zellsortierung durch die FACS-Analyse zugeführt werden. Für die Isolation c-kit(+)-Zellen wurde die positive Selektion gewählt, da es sich nur um einen geringen Anteil der im Herzen residierenden Zellen handelt (Anversa et al. 0,2%). Hierzu wurden die Zellen zunächst mit c-kit-Antikörper (Kaninchen) (s.a. 2.1.7) 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Zur Unterbindung unerwünschter Antigen-Antikörper Interaktionen addierte man Eselsserum in 10%iger Verdünnung. Nach einem Waschschrift mit MWS erfolgte die Inkubation mit dem als Zweitantikörper fungierenden anti-Kaninchen-PE wiederum für 20 Minuten bei 4°C. Um die Zellen der MACS-Analyse zugänglich zu machen inkubierten die Zellen nach erneutem Waschen mit anti-PE-Micro-Beads. Die Zellsuspension wurde im nächsten Schritt durch eine in einem Magnetfeld plazierte Säule gegeben, wobei die mit Metallpartikeln markierten, also c-kit(+)- Zellen in der Säule zurückblieben und die negativen Zellen unberührt die Säule wieder verließen. Die c-kit(+)-Zellen konnten nun, nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war, mit 2 Millilitern MWS aus der Säule gespült werden. Beide MACS sortierten Populationen wurden abschließend mit der Kernfärbung Dapi inkubiert und in FACS-Röhrchen überführt.

2.2.3.5 FACS-Analyse

Die Zellsortierung anhand der FACS-Analyse macht nicht nur eine genaue quantitative Bestimmung und Sortierung verschiedener Zellfraktionen durch ihre antikörpermarkierten jeweiligen Charakteristika möglich, sondern erlaubt ebenso die Beurteilung der Anzahl der toten Zellen und somit, ob eine weitere Kultivierung erfolgen kann. Die FACS-Analyse basiert auf dem Prinzip, dass Zellen einzeln durch eine Messkammer fließen, in deren Verlauf

sie kurzzeitig von einem seitlich angebrachten Laser angestrahlt werden. Eine den Laser kreuzende Zelle verursacht Streulicht, je nach Größe und Granularität der Zelle in verschiedener Intensität und Winkeln, so dass Zellen anhand ihrer Morphologie und Größe in bestimmte Untergruppen eingeordnet werden können (z.B. Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten). Durch Markierung mit fluoreszierenden Zweitantikörpern lassen sich heute eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen anhand ihrer Oberflächenmerkmale analysieren und sortieren. Hierzu wird während des Durchflusses durch die Messkammer die fluoreszierende Gruppe des Zweitantikörpers durch den Laser angeregt und somit als positiv erkannt.

In dieser Arbeit wurde ein aus Kaninchen gewonnener Erstantikörper gegen den Stammzellrezeptor c-kit genutzt, als Zweitantikörper ein gegen den Erstantikörper gerichteter anti-Kaninchen IgG mit angehängtem Fluoreszenzfarbstoff PE. Die Reinheit der durch die FACS-Sortierung gewonnenen Zellen wurde durch FACScalibur™ mit CELLQuest™ Software bestimmt.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Bedingungen der Primärzellkultur

Die Primärzellen (Kardiomyozyten, c-kit(+)-Zellen, c-kit(-)-Zellen) wurden in 96-Well-Platten mit Laminin-Beschichtung ausgesät. Die Kultivierung fand in Inkubatoren bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt statt. Das für die Kultivierung verwendete Medium bestand aus DMEM/F-12 Medium, supplementiert mit 100 U/ mL Penicillin und 100 µg/ mL Streptomycin. Der Mediumswechsel wurde alle vier Tage vorgenommen, indem 2/3 des alten Mediums vorsichtig abgenommen und entsprechende Mengen an frischem Medium hinzugefügt wurden. Diese Prozedur ermöglichte es, die Zellverluste an c-kit(+/-)- Zellen zu minimieren, da diese, im Gegensatz zu Kardiomyozyten, nicht an der Laminin Beschichtung hafteten, sondern sich lediglich absetzten.

2.2.4.2 Bedingungen der Sekundärzellkultur

Die H9c2-Kardiomyoblasten sind adhärent wachsende Zellen und wurden in T75-Flaschen in DMEM-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde mit 100 U/ mL Penicillin und 100 µg/ mL Streptomycin sowie 10 % FBS ergänzt und alle zwei bis drei Tage gewechselt. Hierzu wurden das Medium vollständig abgesaugt, mit Mg²⁺- und Ca²⁺-freiem PBS gewaschen und mit Trypsin (0,25 % (w/v)) / EDTA (0,5 mM) für ca. 1 Minute bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (1 mL/ 25 cm²). Durch eine Kontrolle mit dem Mikroskop wurde gesichert, dass die Zellen sich vollständig gelöst hatten, anschließend wurde zur

Antagonisierung des Trypsins die dreifache Menge an serumhaltigem Medium in die Flasche gegeben. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überfüllt und 5 Minuten bei 1350rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in DMEM resuspendiert und in neue Kulturgefäße in einem Verhältnis 1:4 bis 1:3 ausgesät.

2.2.4.3 Zellstimulation

Die Stimulationsbedingungen für die Primär- und Sekundärzellkultur wurden bezüglich der Konzentration der einzelnen Substanzen und Stimulationsdauer durch Real-Time-PCR ausgewählter Zielgene in mehreren Vorversuchen in der Sekundärzellkultur festgelegt. Die maximalen Effekte der E2-Gabe zeigten sich bei Konzentrationen von 1nM bis 3nM nach 48 Stunden. Unter höherer E2 Administration zeigten sich zudem morphologische Veränderungen an den H9c2-Zellen In allen Versuchen wurde wasserlösliches E2 verwendet; es handelt sich um 17- β -Östradiol, das von einer Hülle Cyclodextrin umgeben ist. Cyclodextrin ist ein zyklisches Oligosaccharid, das einen hydrophoben Kern aufweist, mit dem lipophile Moleküle, wie z.B. Steroidhormone Komplexe bilden können. Das Prinzip der Umkapselung eines lipophilen Moleküls durch ein äußerlich hydrophiles Molekül führt zur Wasserlöslichkeit des lipophilen Moleküls und kann seine Wirkung dramatisch steigern. Folglich wurde das Vehikel, also reines Cyclodextrin in gleicher Konzentration wie E2 bei allen Stimulationen mitgeführt, um mögliche unerwünschte Nebeneffekte ausschließen zu können.

Für die respektiven Östrogenrezeptoragonisten PPT und DPN fanden sich in der Literatur Konzentrationsangaben von 1 μ M bis 10nM. Eigene Konzentrationsreihen für beide Substanzen ergaben in ausgewählten Zielgenen eine maximale Änderung der Expression bei 10nM, so dass diese Konzentration für weitere Versuche beibehalten wurde. Der Östrogenrezeptorantagonist ICI 182,780 wurde gemäß den Herstellerangaben in 10fach höherer Konzentration als die gewählte E2 Menge angewandt, also 10nM-30nM . Die Behandlung mit ICI 182,780 erfolgte 30 Minuten vor der Stimulation mit E2, die Zellen wurden zwischenzeitlich bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Stimulationsbedingungen der Primärzellen wurden aus den in der Sekundärkultur bestimmten Konzentrationen und Inkubationszeiten abgeleitet, nachdem sich aufgrund niedriger Zellzahlen eine ausführliche mRNA-Analyse bestimmter Zielgene unter verschiedenen Dosierungen als schwierig erwiesen hatte. Die E2-Dosis wurde mit 1nM in der Primärzellkultur möglichst niedrig gewählt, die PPT und DPN Konzentrationen wurden beibehalten (10nM). ICI 182, 780 wurde, wie oben erläutert, in 10fach höherer Konzentration

als E2 genutzt. Ein Vergleich zwischen einer 24-stündigen und einer 48-stündigen Stimulation zeigte deutlichere Effekte im Bezug auf das Überleben der Kardiomyozyten nach 48h, so dass alle weiteren Versuche nach 48 Stunden terminiert wurden.

2.2.4.4 Proliferationsbestimmung durch Alkalische Phosphatase-Essay

Die AP ist ein breit genutzter Marker zur Detektion, neben Northern Blotting und immunologischen Verfahren auch zur Detektion im Teilungsprozess begriffener Zellen, da die AP an der Purinsynthese beteiligt ist. Das hier genutzte Alkaline Phosphatase Detection Kit-I (s.a. 2.1.5) ermöglicht es, proliferierende H9c2-Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop in roter Färbung sichtbar zu machen. Die Nutzung erfolgte nach Herstellerprotokoll; zunächst wurden die H9c2-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und mit E2, PPT, DPN, ICI 182, 780 wie unter 2.2.4.3 beschrieben, stimuliert. Cyclodextrin wurde neben einer unbehandelten Negativkontrolle als Vehikel verwendet. Nach 48 Stunden wurden das Medium komplett entfernt, jedes Well zweimal mit PBS gewaschen und vollständig abgesaugt. Die verschiedenen Reagenzien des Kits wurden dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer (100mM Tris-HCl, pH 8,2-8,5) protokollgemäß hinzuaddiert und 80µl in jedes Well gegeben. Die anschließende Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur, wonach die Lösung entfernt und jedes Well zweimal mit PBS gespült wurde. Zur Auswertung wurde das Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRE2 genutzt.

2.2.4.5 Apoptosemessung

Während apoptotischer Prozesse kommt in der Zelle nicht nur zu morphologischen Veränderungen, wie Zellschrumpfung, pyknotischen Nuklei und Chromatinkondensierung; zudem werden Endonukleasen über das Protein p53 aktiviert und degradieren daraufhin die DNA zu Oligonukleosomen. An den Enden dieser DNA-Fragmente finden sich klassischerweise freie 3'-OH-Gruppen, die in der hier gewählten Methode - auch unter dem Kürzel TUNEL bekannt - durch den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein mittels einer enzymatisch katalysierten Reaktion markiert und somit mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Für die vorliegende Arbeit wurde das Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit zur Markierung apoptotischer Kardiomyozyten in der Primärzellkultur genutzt. Die verschiedenen Gruppen (Kardiomyozyten + c-kit(+)-Zellen Kokultur / Kardiomyozyten + c-kit(-)-Zellen Kokultur / Kardiomyozyten Monokultur) wurden in allen Schritten gleich behandelt. In den Waschschrritten wurde 1xPBS genutzt. Nach erfolgter Stimulation (s.a. 2.2.4.3) wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen ein mal mit PBS

gewaschen. Die Zellen wurden nun zur Fixierung zunächst für eine Stunde bei 24°C in 4 % Paraformaldehyd inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und in 0,3 % Triton-X für 15 Minuten auf Eis gelagert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde schließlich das Enzym gemeinsam mit einer die Fluorescein-markierten Desoxynukleotiden enthaltenden Lösung auf die Zellen gegeben. Bei dem Enzym handelt es sich um die Terminale Desoxyribonukleid Transferase (TdT), die in apoptotischen Zellen eine Reaktion katalysiert, bei der an die exponierten

3'-OH-Enden der DNA-Fragmente Fluorescein-markierte Desoxynukleotide gebunden werden. Es folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer. Für die Negativkontrolle der Reaktion wurde lediglich die Desoxyribonukleotid-Lösung ohne Enzymzugabe auf die Zellen geben. Die Positivkontrolle bestand aus einer zehnminütigen Inkubation mit DNase I, deren Wirkung ebenfalls in einer DNA-Degradierung besteht. Daraufhin wurde nach einmaligem Waschen mit PBS das Enzym TdT mit der Desoxyribonukleotid-Lösung addiert und ebenfalls eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Reagenzien aus allen Wells abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen; die Kernfärbung mit Dapi (s. 2.2.6.1) schloss sich in 1:10000000 Verdünnung mit 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur direkt an. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRE2, indem bei 200x – Vergrößerung acht verschiedene Ausschnitte zufällig ausgewählt und die Zellen gezählt wurden. Die Ermittlung des apoptotischen Indexes erfolgte durch Teilung der Fluorescein(+)-Kardiomyozyten durch die Gesamtzahl der Kardiomyozyten multipliziert mit 100.

2.2.4.6 Calcein-Färbung

Die Calceinfärbung ermöglicht es, mittels Fluoreszenzmikroskop lebende von toten Zellen zu unterscheiden und durch Zellzählung einen Überlebensindex zu ermitteln. Der nichtfluoreszierende Farbstoff Calcein-AM wird in lebenden Zellen von einer intrazellulären Esterase zu Calcein konvertiert, welches grün fluoresziert. Tote Zellen bleiben ohne Fluoreszenz. Diese Methode wurde sowohl in primären Kardiomyozyten/c-kit(+/-)-Zellkulturen als auch an H9c2 angewandt. Die Zellen wurden zunächst einmalig mit 1xPBS gewaschen, nachdem das Medium vollständig abgesaugt worden war. Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 60 Minuten bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % O₂ mit 2 µM Calcein. Nach zweimaligem Waschen mit PBS konnten die lebenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop erfasst werden. Der Index überlebender Zellen wurde nach folgender

Formel ermittelt: Calcein(+)-Kardiomyozyten geteilt durch Gesamtkardiomyozytenzahl multipliziert mit 100.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Isolation von mRNA und cDNA Synthese

Die Isolation von mRNA aus kultivierten Zellen und Gewebeteilen erfolgte nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion mit TRIZOL[®] nach Angaben des Herstellerprotokolls (Invitrogen, D). Vor der Isolation der mRNA wurden Zellen und Gewebe mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators zerkleinert. Die kultivierten Zellen wurden von ihrem Überstand befreit, mit PBS gewaschen, mit TRIZOL[®] überschichtet und nachfolgend abgeschabt.

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten mRNA wurde der Absorptionskoeffizient bei 260 nm zu 280 nm bestimmt, das Verhältnis der Extinktionen berechnet und nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet. Ein kleineres Verhältnis weist auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Salzurückständen hin, die die reverse Transkription in cDNA und die Real-time PCR stören.

2.2.5.2 RT-Reaktion zur cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese wurde zunächst ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurde 1 µg RNA mit je 1 µL RQ1 RNase free 10x Reaction Buffer und DNase (1U/ µg RNA) versetzt und mit H₂O auf 10 µL ergänzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurde 1 µL Stop-Solution zugefügt und 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Probe wurde bis zur Fortsetzung des Protokolls auf Eis gekühlt.

Der RNA wurde dann 1 µL Random-Hexamer-Primer zugesetzt und die Mixtur 5 Minuten bei 70 °C denaturiert. Nach erneuter Überführung auf Eis wurde die RNA dann mit folgenden Reagenzien versetzt:

Komponente	eingesetztes Volumen (µL)
5x M-MLV-Reaktionspuffer	5
dNTPs (je 25 mM)	1,25
M-MLV (200 U/ µL)	0,5 (100 U pro Ansatz)
RNAsin	0,5
H ₂ O	ad 13

Tabelle 3: Zusammensetzung des RT-Reaktionansatzes zur cDNA-Synthese.

2.2.5.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Technik, mit der man gezielt DNA-Fragmente vervielfältigen kann. Zur Amplifizierung wird eine DNA-Polymerase benötigt, die bei den unterschiedlichen Temperaturschritten der PCR thermostabil ist. Hinzu kommen geringe Mengen der DNA-Matrize, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), und sequenzflankierende Oligonukleotidprimer. Der PCR-Zyklus besteht am Anfang aus der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges. Nach der Hybridisierung des Primers an die einzelsträngige DNA (Annealing) beginnt die Polymerase vom freien 3'-OH Ende des Primers aus, einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren (Elongation). Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das eigentliche Merkmal der Amplifikation liegt in der zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die vorhandene Menge an DNA exponentiell vermehrt wird, da auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize dienen.

Für die Amplifizierung wurde die *Taq*-Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus*, eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler nach der in Tabelle 4 angegebenen Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprogramm. Der Erfolg und die Ausbeute der PCR wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Komponente		eingesetztes Volumen (µL)
cDNA (≈40 ng)		1
10x Puffer		2,5
MgCl ₂ (50 mM)		1
dNTPs (je 25 mM)		0,5
forward Primer (10 µM)		0,5
reverse Primer (10 µM)		0,5
Taq-Polymerase (5U/µL)		0,125
H ₂ O		ad 25
Zyklus	Temperatur	Zeit
1 (1x)	95 °C	5 min
2 (35x)	94 °C (Denaturierung)	1 min
	60 °C (Annealing)	1 min
	72 °C (Elongation)	1 min
3 (1x)	72 °C	10 min

Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz und Temperaturprogramm.

2.2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA macht eine Auftrennung ihrer Fragmente durch ein elektrisches Feld möglich. Sie wandern - je nach ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit - durch die Poren der Agarose, wobei die Konzentration des Gels die Analysierbarkeit der Fragmentgröße bestimmt. Für diese Arbeit wurden 2% Agarosegele genutzt. Eine weitere wichtige Komponente besteht aus dem Farbstoff Ethidiumbromid (Konzentration 0,2µg/mL), der in die DNA interkaliert und somit die Detektion der Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht ermöglicht. Die DNA-Proben werden mit einem 10x Ladepuffer (Orange G) versetzt und in die im Gel vorhandenen Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung des zu analysierenden Fragmentes wird ein Größenmarker mit aufgetrennt. Der Gelelektrophoreselauf wird in einer Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von 80 – 100 V in 1x TAE-Puffer für 30 bis 45 Minuten durchgeführt.

2.2.5.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR)

Die Real-Time –PCR bietet die Möglichkeit, durch Messung eines Fluoreszenzsignals bei jedem Amplifikationszyklus die Menge an cDNA in Echtzeit zu verfolgen. Während eines jeden Zyklus' findet im Idealfall eine Verdopplung des PCR-Produktes statt. Für die Reaktion wurden 96-Well Platten genutzt, pro Probe waren drei Wells vorgesehen, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen, indem später ein Mittelwert aus den jeweiligen drei Proben gebildet wurde. In jedes Well wurde der in Tabelle 1 aufgeführte Master-Mix vorgelegt und dann die cDNA hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte mithilfe einer für jedes untersuchte Gen angefertigten Standardkurve. Als „Haushaltsgen“ wurde β -actin genutzt.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Diese Methode ermöglicht es, durch eine Immunreaktion gezielt Proteine innerhalb einer Zelle nachzuweisen und zu lokalisieren. Zellen der Primär- und Sekundärzellkultur wurden nach dem unter 2.2.6.1 beschriebenen Protokoll behandelt.

2.2.6.1 Färbung von kultivierten Zellen

Um den Antikörperverbrauch zu minimieren, wurden die für Immunfluoreszenz destinierten Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Die Stimulation erfolgte wie unter 2.2.4.3 beschrieben und die Färbung wurde mit nachfolgendem Protokoll am Ende der Stimulationszeit begonnen:

- 2x mit PBS waschen

- 4% Paraformaldehyd 30 Minuten bei Raumtemperatur [Fixierung]
- Paraformaldehyd absaugen und 1x mit PBS waschen
- 0,2% Triton-X 10 Minuten auf Eis [Permeabilisierung]
- 3x waschen mit PBS
- Blocken mit 10 %igem Eselserum 20-30 Min bei Raumtemperatur (RT)
- 1. Primärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT oder über Nacht bei 4 °C
- 3x waschen mit PBS
- 1. Sekundärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT unter Lichtausschluß
- 3x waschen mit PBS
- Blocken mit 10 %igem Eselserum 20-30 Min bei Raumtemperatur (RT)
- 2. Primärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT oder über Nacht bei 4 °C
- 3x waschen mit PBS
- 1. Sekundärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT unter Lichtausschluß
- 3x waschen mit PBS
- Dapi 1:100000 Verdünnung 5 Minuten
- 2x waschen mit PBS

Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIRF) ausgerüstet mit der firmeneigenen Software (Openlab 3, Improvision). ER α - und ER β -Antikörper wurden in PBS mit 10% Esels serum und 1% Triton-X auf die Zellen gegeben um die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen.

2.2.6.2 Färbung von Kryoschnitten

Die Immunfluoreszenz-Färbung an Gewebeschnitten ermöglicht es, in einem *in vivo* Kontext die Regulation bestimmter Proteine nach pathologischen Ereignissen oder Administration bestimmter Substanzen zu detektieren. Als Negativkontrollen dienen in diesem Fall Sham-operierte Tiere. Die bei -80°C konservierten Schnitte wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, daraufhin mit 10 %igem Eselserum 20-30 Min bei Raumtemperatur blockiert. Die anschließende Prozedur erfolgte wie unter 2.2.6.1, wobei die Schnitte nach der Kernfärbung mit Dapi und dem anschließenden zweimaligem Waschen jeweils mit einem Tropfen Mounting Medium (Dako) und Deckgläschen versehen wurden. Auch hier erfolgte die Auswertung der Fluoreszenz mit dem Leica DMIRF Fluoreszenzmikroskop.

2.2.6.3 Konfokale Mikroskopie

Um die Verteilungsmuster einzelner Moleküle, wie dem c-kit-Rezeptor und ER α in den c-kit(+)-Zellen im Myokard genauer zu charakterisieren, wurden Detailaufnahmen aus Schnitten der Periinfarktzone mithilfe eines konfokalen Mikroskops gemacht. *Vergrößerung?*

Die konfokale Mikroskopie beruht auf dem Prinzip, dass durch eine in den Strahlengang integrierte Lochblende alle Ebenen, die nicht innerhalb des Fokus' liegen, ausgeblendet werden. Der Fokus wird vom Mikroskop schrittweise verschoben, sodass eine besonders gute Tiefenschärfe erreicht wird. Dies ist der Hauptvorteil gegenüber konventionellen Mikroskopen. Durch Fluoreszenz-Messungen ist eine Verfolgung von Partikeln innerhalb der Zelle möglich.

2.2.7 Proteinbiochemie

2.2.7.1 Western Blotting

Je nach Zielprotein wurden 10 μ g bis 50 μ g Gesamtprotein für 5 Minuten bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt. Die Proben wurden in die Taschen eines 7,5-12%igen SDS-Polyacrylamidgels geladen (Tabelle 5) und unter Mitführung eines Molekulargewichtsmarkers elektrophoretisch bei 120 Volt für 90 Minuten aufgetrennt. Das Prinzip der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) eignet sich zur Auftrennung von Proteingemischen in einer Polyacrylamidgelmatrix. SDS überdeckt durch Bildung geladener Micellen die Eigenladung von Proteinen, welche nachfolgend elektrophoretisch getrennt werden können. Die Porengröße des Gels wird durch die Acrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad bestimmt, und dient zur Aufkonzentrierung (Sammelgel) bzw. Auftrennung der Proben (Trenngel).

Komponente	Sammelgel in μL	Trenngel in μL (10 %)
Acrylamid/Bis-, 30%	4000	670
Gelpuffer	3000	1000
H ₂ O	6100	2300
Ammoniumpersulfat 10 %	60	30
TEMED	6	5

Tabelle 5: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine unter Verwendung einer „nass-blotting“-Apparatur (Biorad) und eines Nass-Blotpuffers auf eine Nitrocellulosemembran für 60 Minuten bei 100 V transferiert. Die Membran wurde in 5 %igen Blockpuffer (TBST-Puffer mit 5 % Trockenmilchpulver) bei Raumtemperatur für 60 Minuten geblockt. Der Primärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in 5 %igen Blockpuffer auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 3-maliges Waschen für je 10 Minuten mit TBS-T-Puffer entfernt, bevor die Membran mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:2000 in 5 %igem Blockpuffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach weiteren 3 Waschschritten für je 10 Minuten mit TBS-T-Puffer erfolgte die Peroxidasereaktion mit ECL-Reagenz als Chemilumineszenz und die Auflage eines lichtempfindlichen Films. Nach entsprechender Expositionszeit (1 Minute bis 30 Minuten) wurde der Film entwickelt und digitalisiert.

2.2.8 Statistische Analysen

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- der Standardabweichung vom Mittelwert dargestellt. Vergleiche unter verschiedenen Gruppen (>2) wurden mit der one-way analysis of varians-tests (ANOVA) gefolgt vom Bonferroni post-hoc test durchgeführt. Handelte es sich um einen Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der two-tailed unpaired t-Test genutzt. Wahrscheinlichkeiten von $P < 0,05$ wurden als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Erhöhung des ER α -Proteins in Myokardinfarktgewebe

Die Präsenz und Regulation der beiden Östrogenrezeptoren (ERs) in Herzgewebe von Ratten, die sieben Tage zuvor durch Ligation der LAD einen Herzinfarkt erlitten hatten, wurden in untersucht. Als Kontrolle dienten die ebenfalls vor sieben Tagen operierten Sham-Ratten (n=4). Sieben Tage nach induziertem Myokardinfarkt konnte in der Randzone des Infarktes aus Tieren mit akutem Myokardinfarkt (n=7) (AMI) durch eine Western Blot-Analyse eine 1,9-fach erhöhte Menge an ER α -Protein - verglichen mit Sham-operierten Tieren (n=7) – festgestellt werden. Die Gleichmäßigkeit der Gelbeladung wurde durch das basal exprimierte Haushaltsgen GAPDH kontrolliert. Die Menge an ER β -Protein zeigte keine Signifikante Abweichung zwischen beiden Gruppen (Abbildung 1).

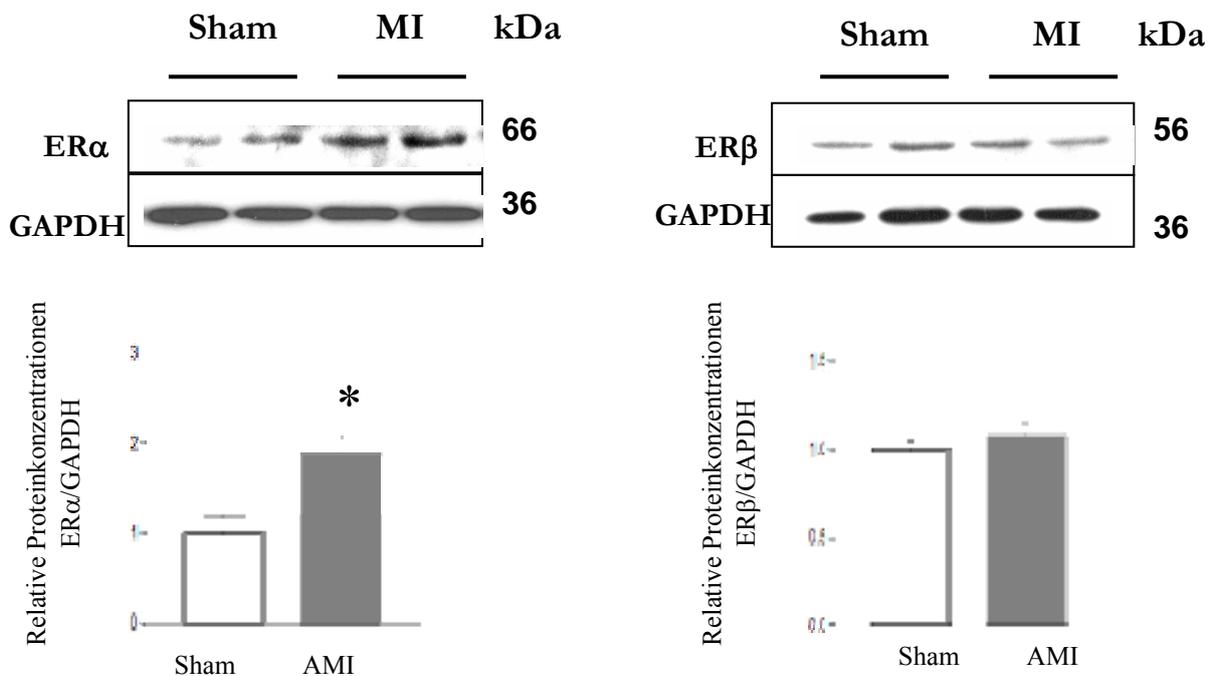
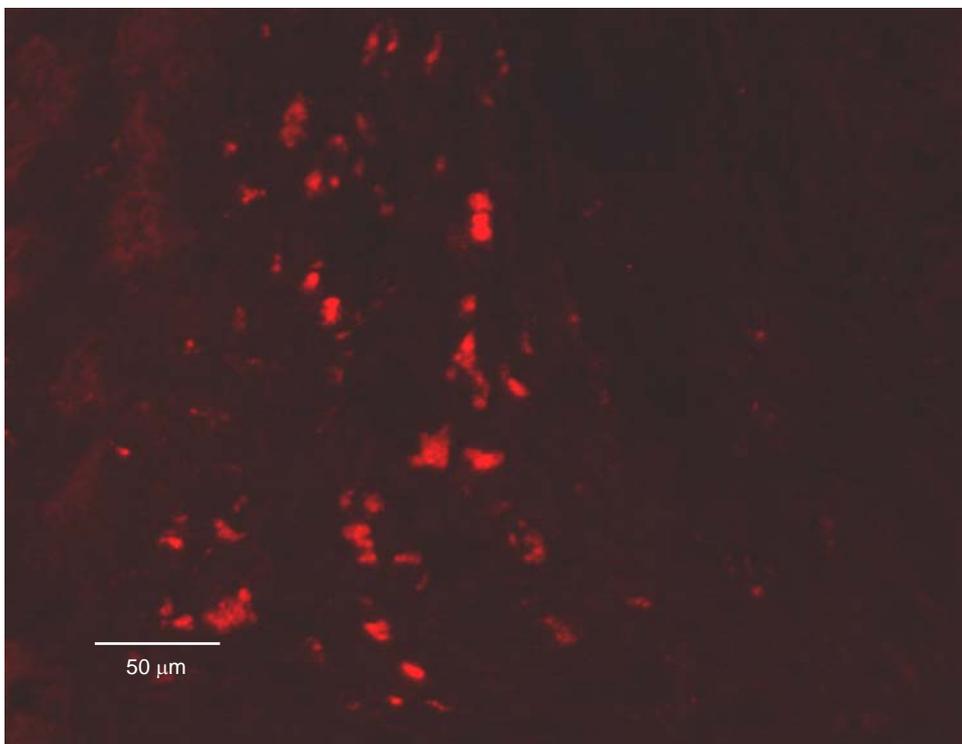


Abb. 1: Western Blot-Analyse von ER α und ER β . Kontrolle der Gelbeladung durch GAPDH. 1,9-fach erhöhte Expression von ER α nach Myokardinfarkt versus Sham Operation. Expression von ER β

ist nach Myokardinfarkt unverändert. Die Infarktzone unterschied sich vom übrigen Myokardgewebe durch ihre blasse Verfärbung. n=7, *P<0,05 versus Sham Operation.

3.2 ER α wird in BrdU(+)-Zellen der Randzone des Infarktes exprimiert

Um die mögliche Präsenz von proliferierenden Zellen im kardialen Gewebe nach Myokardinfarkt zu untersuchen, erhielt die Gruppe der Ratten mit induziertem AMI 7 Tage nach der Operation drei Injektion mit BrdU (Tag 2, 4, 6). Das Thymidin-Analogon BrdU wird von proliferierenden Zellen während der Mitose in die DNA inkoporiert und ist daher ein Marker für proliferative Prozesse. Die angefertigten histologischen Schnitte wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. Wie in Abbildung 2 gezeigt, wurde ein Antikörper gegen BrdU (anti-Maus) sowie ein Antikörper gegen ER α (ER α -anti Kaninchen) genutzt. In der Randzone des Myokardinfarktes zeigten sich BrdU(+)-Zellen mit einem Durchmesser von 7-12 μ m, die diffus im kardialen Gewebe um das Infarktgebiet verteilt waren. Der überwiegende Teil (ca. 89%) dieser Zellen zeigte sich in der Immunfluoreszenz-Färbung positiv für das ER α -Protein.



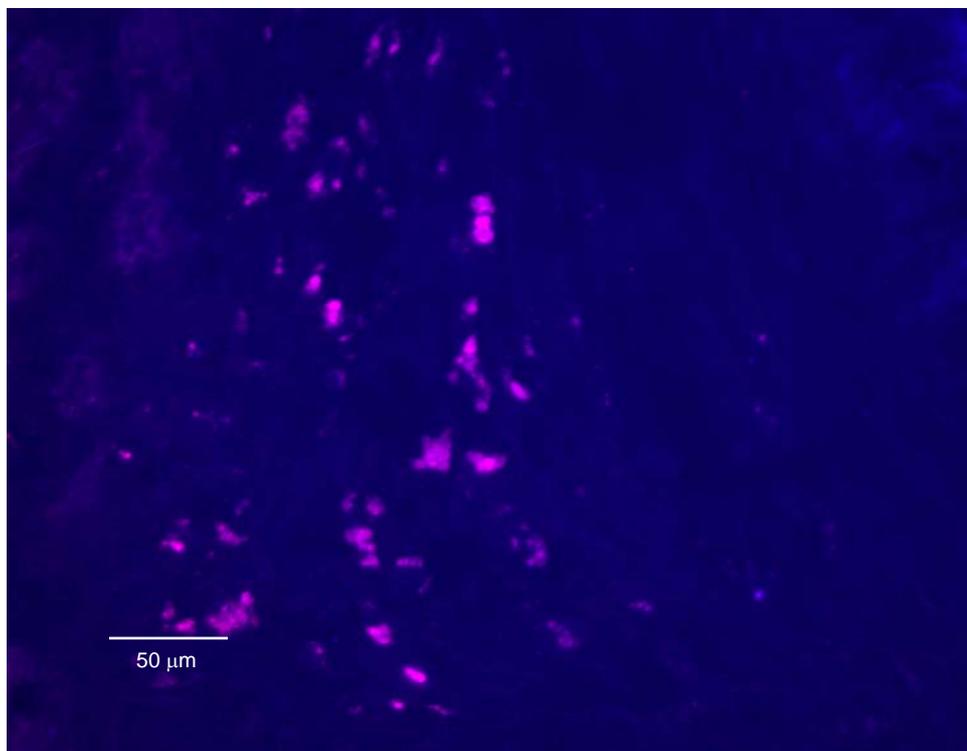
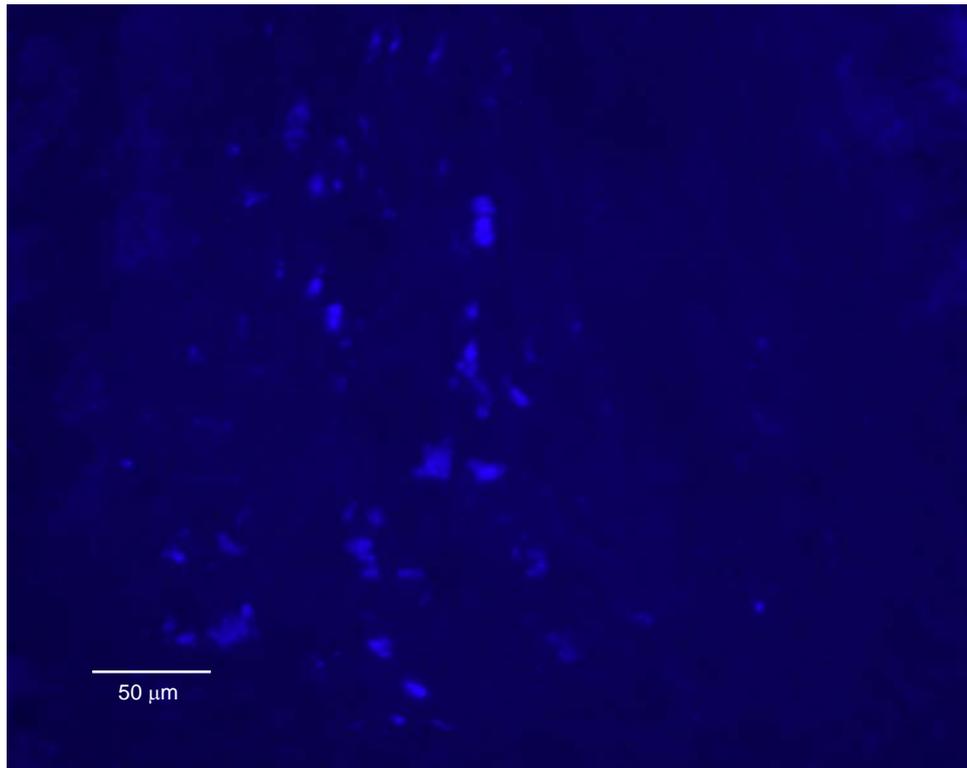
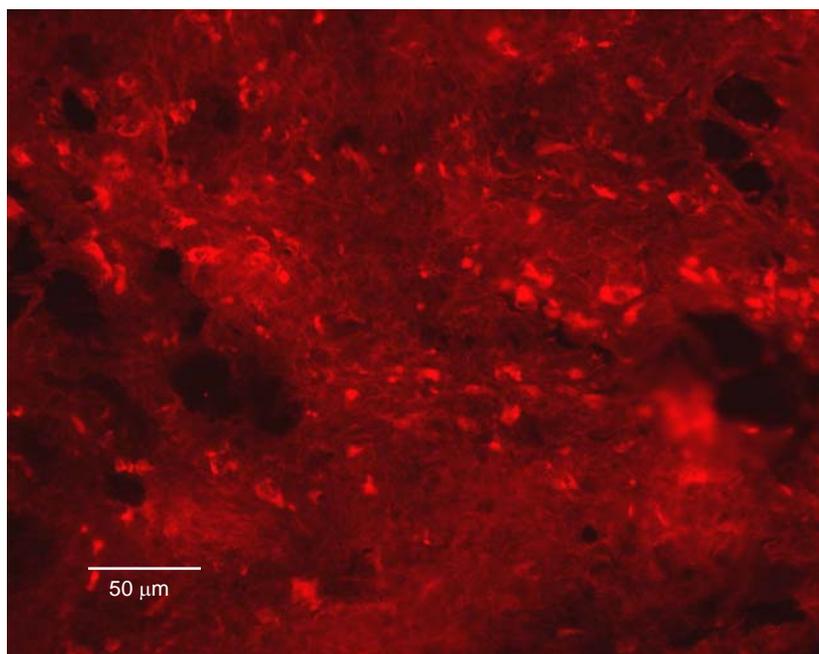
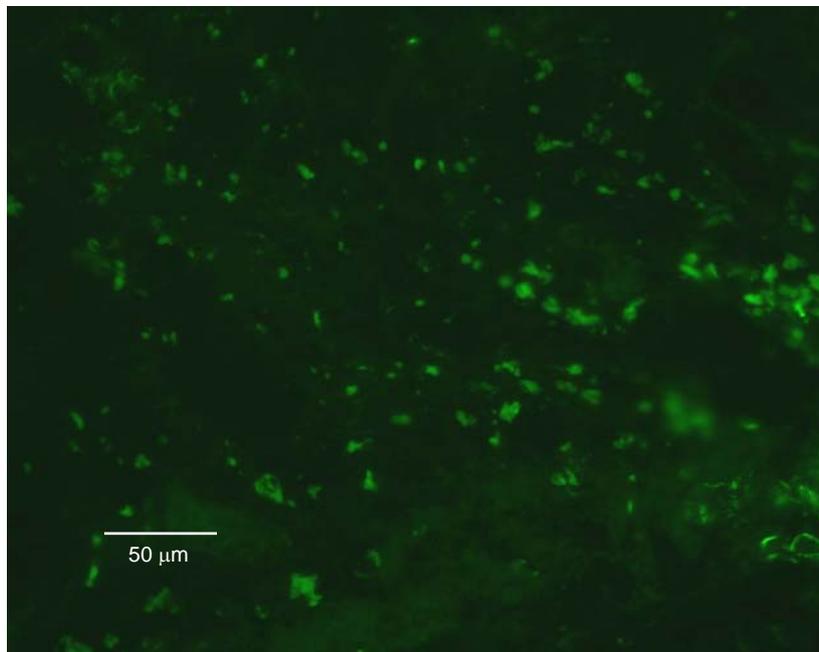


Abb. 2: Immunofluoreszenz-Färbung mit ER α - und BrdU-Antikörper. 400-fach. **Oben:** Randzone des Infarktes; rot = ER α positiv. **Mitte:** gleicher Abschnitt: blau = BrdU positiv. **Unten:** BrdU und ER α übereinandergelegt.

3.3 Präsenz des ER α in sca-1(+)/c-kit(+)-Zellen der Periinfarktzone

Um die im Western-Blot erhobene erhöhte Konzentration des ER α -Proteins weiter zu untersuchen, wurden histologische Kryoschnitte des Infarktes und seiner Randzone angefertigt. Zudem sollte die weitere Charakterisierung der BrdU(+)-Zellen erfolgen. Die Schnitte wurden mit einer zweifachen Immunfluoreszenz-Färbung behandelt; es wurden spezifische Antikörper gegen den ER α (ER α -anti Kaninchen) sowie Antikörper gegen die Stammzellmarker c-kit (c-kit-anti Ziege) und sca-1 (sca1-anti Maus) genutzt. Im Randgewebe des Infarktes zeigten sich im kardialen Parenchym lokalisierte sca1(+)-Zellen. Sie lagen diffus oder als kleine Agglomerate zwischen den Kardiomyozyten. Ihr überwiegender Teil wies eine Koexpression von sca1 und ER α auf (Abbildung 3 und 4).



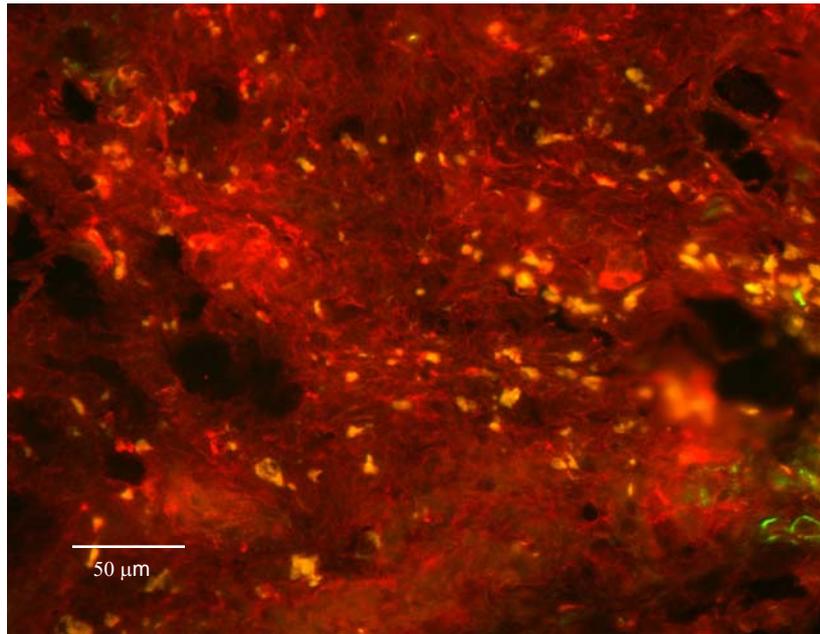


Abb. 3: Immunfluoreszenz-Färbung mit ER α -und sca1-Antikörper. Periinfarktzone 400-fach. **Oben:** Grün = ER α positiv. **Mitte:** rot = sca-1 positi. **Unten:** Vorherige Bilder übereinandergelegt. Maßstab: 50 μ m

Die Untersuchung weiterer Schnitte der Randzone des Infarktes mit c-kit- und ER α -Antikörpern zeigte eine Ansammlung von c-kit(+)-Zellen die zu ca. 75 % (27x100/37) auch den ER α aufwiesen (Abbildung 5). Die Abbildung 6 wurde mithilfe eines konfokalen Mikroskops angefertigt zeigt ein Detail von Abbildung 5, in dem eine stärkere Dapi-Kernfärbung in den Nuklei der c-kit(+)-Zellen zu sehen ist, was auf eine erhöhte DNA-Synthese hindeutet. Das Zytoplasma dieser Zellen weist intensive Signale für den ER α auf.

Es zeigte sich eine insgesamt schwach ausgeprägte ER α -Expression im umliegenden kardialen Gewebe; die stärkste, durch Immunfluoreszenz erhobene Expression, zeigte sich in den c-kit(+) und sca1(+)-Zellen. Färbungen für andere Zelltypen, die häufig in infarktiertem kardialen Gewebe zu finden sind, zeigten schwache oder keine ER α -Expression. Zu ihnen gehörten das Gewebe infiltrierende CD4(+)- und CD8(+)-Lymphozyten, Kardiomyozyten (positiv für α -sarkomerisches Aktin), ED1(+) Makrophagen, Vimentin(+) Fibroblasten und von-Willebrand-Faktor(+) Endothelzellen.

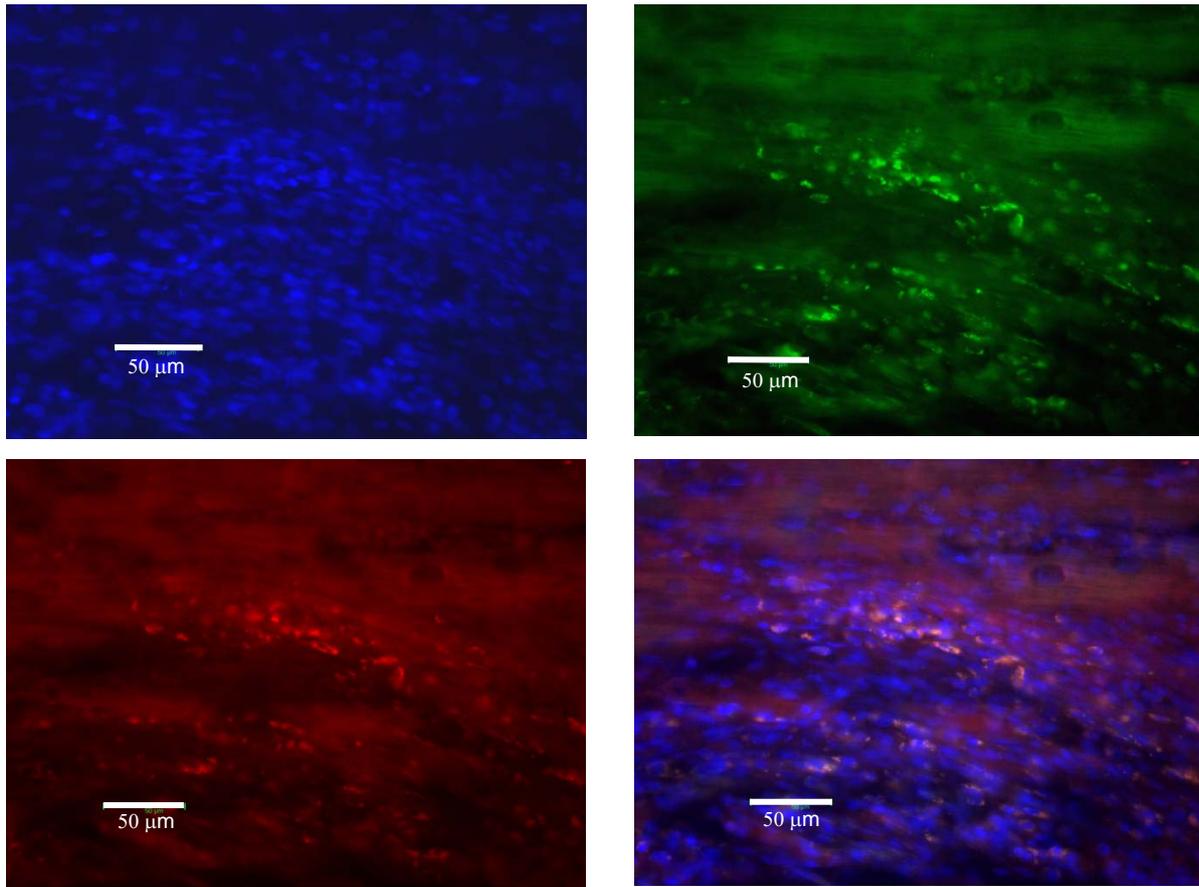


Abb. 4: Immunofluoreszenz - Färbung mit ER α - und c-kit-Antikörper sowie Kernfärbung mit Dapi. Periinfarktzone. 200-fach vergrößert. **Links oben:** blau; dapi Kernfärbung. **Rechts Oben:** grün = ER α positiv. **Links Unten:** rot = c-kit positiv. **Rechts Unten:** Vorherige Bilder übereinandergelegt.

3.4 Ex-vivo Isolation und Charakterisierung von c-kit(+)-Zellen

Um die Präsenz und mögliche Funktion von ER α in der c-kit(+)/sca1(+)-Zellpopulation zu bestätigen und zu analysieren, wurden die Zellen sieben Tage nach Myokardinfarkt aus dem kardialen Gewebe isoliert. Als Stammzellmarker wurde c-kit genutzt, da sich dieser Zellwandrezeptor ausschließlich auf Stamm- und Vorläuferzellen befindet und nicht, wie sca1, auch in reifen Zellen in Parenchymenten verschiedenster Organe zu finden ist. Durch MACS-Analyse (Punkt 2.2.3.4) erfolgte die positive Selektion einer c-kit(+)-Population, die anschließend durch FACS-Sortierung weiter aufgereinigt wurde. In AMI-Herzen lag die Zahl der durch FACS-Isolation (Punkt 2.2.3.5) gewonnenen Zellen zwischen $2,1 \pm 0,7 \times 10^5$ (Abb. 7) Die Reinheit der Population lag bei 95-99%. Um eine mögliche Verbindung der aus dem Herzen isolierten Population zu anderen Geweben oder Zelltypen im Hinblick auf

Immigrationsvorgänge differenzieren zu können, wurde die Population auf das panmyelozytische Markerprotein CD45 untersucht; 50% der Zellen zeigten sich positiv. Zudem wies die Population eine 5%ige Expression von CD34 auf. CD34 ist ein Markerprotein für Stammzellen der Hämatopoiese und wird zudem in Vorläuferformen sowie differenzierten vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert. In Sham-operierten Herzen zeigte sich eine Ausbeute von $0,2 \pm 0,02 \times 10^5$ c-kit(+)-Zellen (Abb. 8). Die aus den AMI-Herzen isolierte Population - macht im Einklang mit verschiedenen anderen Arbeitsgruppen - etwa 0,175-0,2% der gesamten kardialen Zellzahl aus. Die Untersuchung der Zellen mittels Immunfluoreszenz-Histochemie zeigte eine überwiegende Expression von c-kit und sca-1 in den isolierten Zellen. Von den isolierten Zellen zeigten 93% eine Expression von c-kit und 85% waren positiv für sca1. Die c-kit(+)-Population überlebte 3-6 Monate unter Kulturbedingungen, ein wichtiges Kriterium für die Eigenschaften einer Stammzelle. Eine Proliferation fand in nur sehr geringem Maße statt.

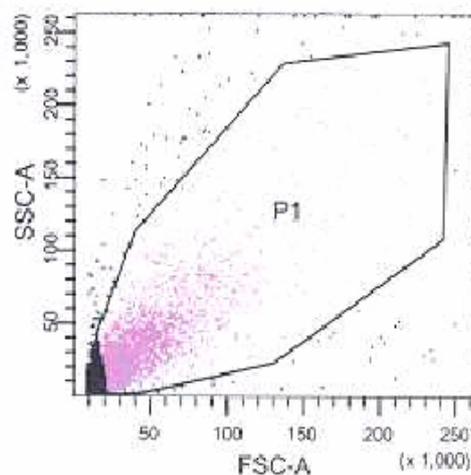
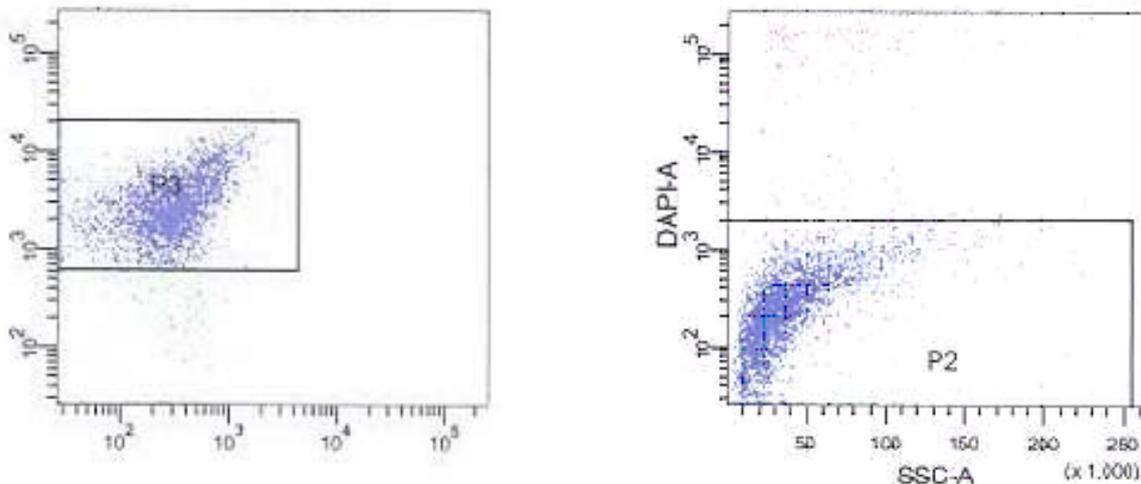


Abb 7: FACS Analyse zur Sortierung einer durch MACS-vorsortierten c-kit+Zellpopulation aus AMI-Rattenherzen.

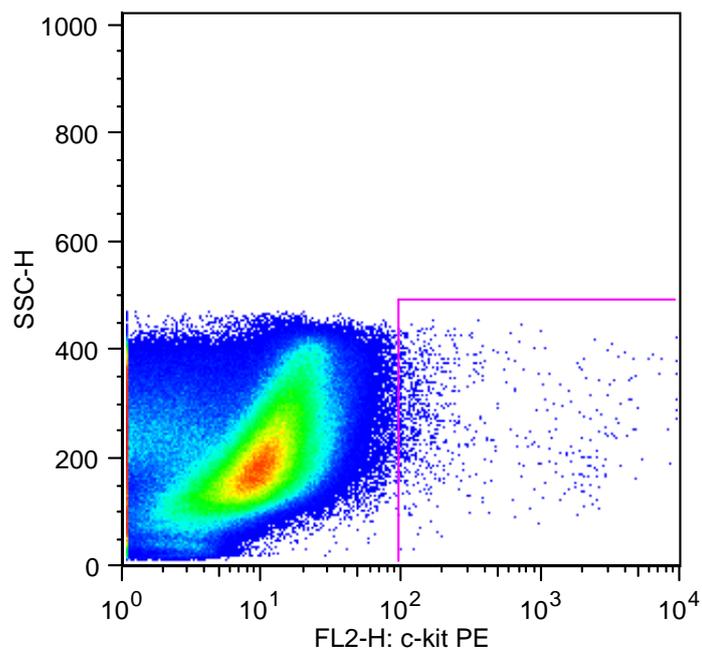


Abb 8: FACS Analyse zur Sortierung einer durch MACS-vorsortierten c-kit+Zellpopulation aus Sham-Rattenherzen.

Der Marker c-kit blieb über den gesamten Zeitraum in 75% der Zellen nachweisbar. sca1 war nach drei Monaten in 91,6% der Zellen vorhanden, was möglicherweise daran liegt, dass ein geringer Anteil der Population in Differenzierungsprozesse eintrat, wobei die c-kit Expression rückläufig war, die sca1-Expression jedoch ebenfalls in den differenzierten Zelltypen persistierte (Abbildung 9a und 9b).

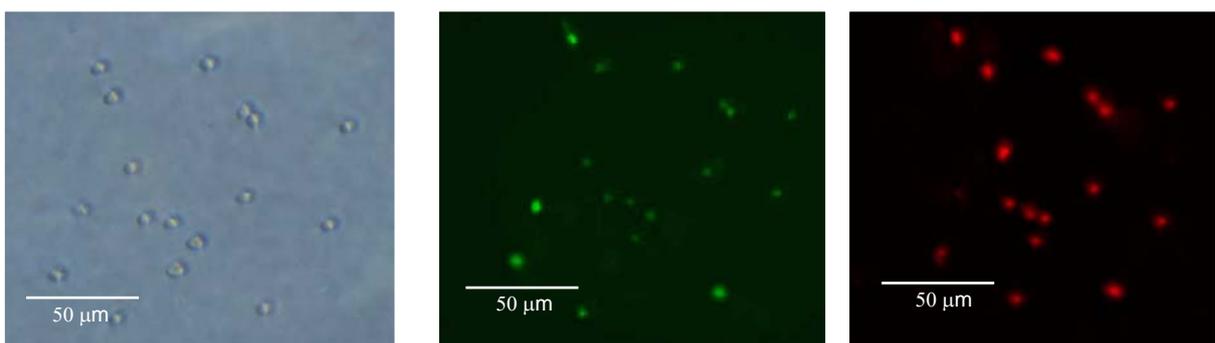


Abbildung 9a: c-kit(+)-Zellpopulation am Tag 1 nach Isolation aus dem Rattenherzen. **Links:** Phase-Kontrast Aufnahme. **Mitte:** Immunfluoreszenz-Färbung; grün = sca-1 positiv. **Rechts:** Immunfluoreszenz Färbung; rot = c-kit positiv.

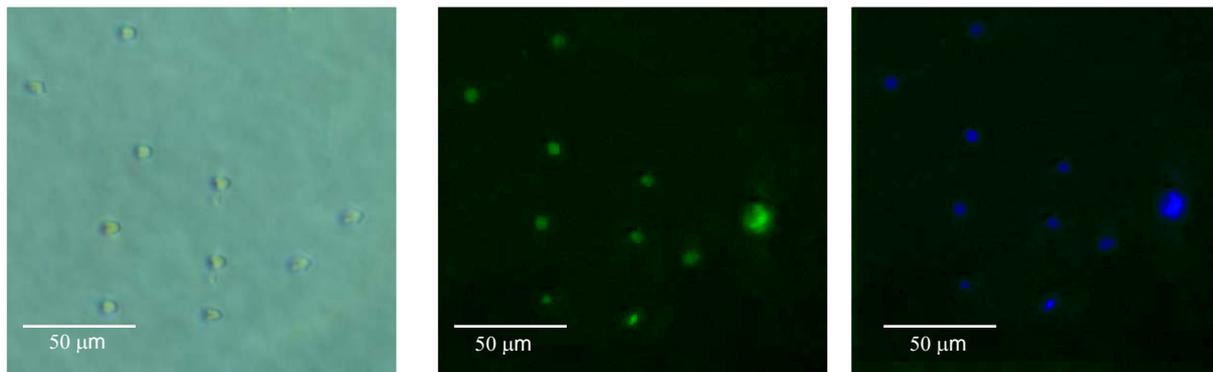


Abbildung 9b: c-kit(+)-Zellpopulation 3 Monate nach Isolation aus dem Rattenherzen. 400-fach. **Links:** Phase-Kontrast Aufnahme. **Mitte:** Immunfluoreszenz-Färbung; grün = sca-1 positiv. **Rechts:** Immunfluoreszenz Färbung; blau= c-kit.

3.5 Untersuchung der Expression von ER α und ER β in c-kit(+)-Zellen sowie Proliferationsmarker in c-kit(+)-Zellen

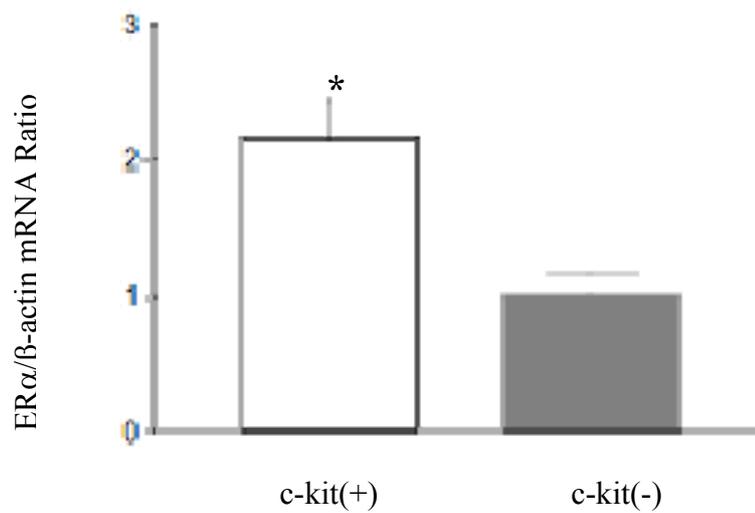
Zu diesem Zeitpunkt trat ein wichtiger Aspekt in den Vordergrund, nämlich die Expression von ER α in kardial isolierten c-kit(+)-Zellen zu bestätigen und mögliche Einflüsse auf das Expressionsniveau des Rezeptors durch molekularbiologische Methoden zu untersuchen.

Die c-kit(+)-Zellen wurden nach Beendung der Isolation in 1 x PBS bei 12.000 rpm zentrifugiert und zur RNA-Isolation in Trizol überführt, in cDNA transkribiert und mittels Real-Time-PCR quantifiziert (Punkt 2.2.5). Als Kontrolle wurden Zellen aus den jeweils gleichen Isolationen genutzt, die in der FACS-Analyse als negativ für c-kit sortiert worden waren. Weder die c-kit(+)- noch die c-kit(-)-Zellfraktion enthielt Kardiomyozyten, da diese durch einen Percoll®-Dichtegradienten zuvor von den Zellen geringeren Durchmessers getrennt und in Kultur genommen worden waren.

Die Untersuchung durch Real-Time-PCR zeigte eine Expression von ER α in beiden analysierten Populationen. In der c-kit(+)-Population fand sich verglichen mit der Kontrollpopulation eine signifikante, 2,1-fach erhöhte Expression von ER α (Abbildung 9, links). Um einen Vergleich zwischen den Expressionsniveaus beider Rezeptoren zu erhalten,

wurde ER β ebenfalls durch Real-Time-Analyse in beiden gewonnenen Populationen untersucht; es zeigte sich eine Expression des ER β in sowohl c-kit(+) als auch c-kit(-)-Zellen. Die Quantifizierung des Rezeptors ergab nur sehr geringe Unterschiede in der mRNA-Konzentration beider Populationen (Abbildung 9, unten).

Expression von ER α in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen



Expression von ER β in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen

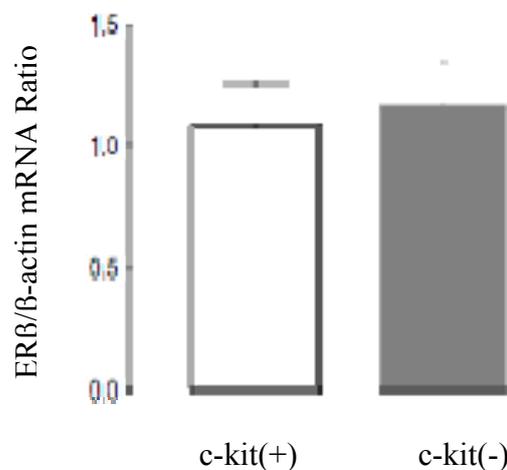
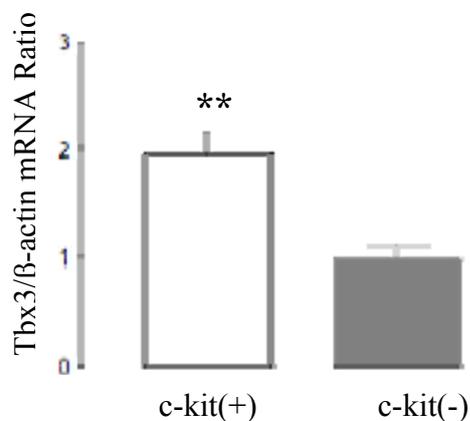


Abbildung 9: Quantifizierung der mRNA-Niveaus des ER α und ER β durch Real-Time PCR in einer FACS-sortierten c-kit(+)- und einer c-kit(-)-Zellpopulation. **Oben:** 2,1-fach erhöhte Expression von

ER α in c-kit(+)-Zellen. **Unten:** Expression von ER β bleibt in beiden Populationen annähernd gleich. Expression mit dem Haushaltsgen β -actin verglichen. n=4, *P<0,05 Versus c-kit(-)-Zellpopulation.

Da ER α in vielen Kontexten proliferative Eigenschaften zugeschrieben werden, wurde das Augenmerk weiterhin auf Gene gerichtet, die proliferative Eigenschaften der Zelle steuern (Kapitel 1.6.2). Im Zuge ihrer Differenzierung verlieren viele Zelltypen ihre Fähigkeit zu einer stetigen und extensiven Zellteilung, wie Stammzellen sie besitzen; ein interessanter Aspekt lag daher in der Frage nach der Expression des einschlägigen Proliferationsfaktors c-myc. Tbx-3 gilt als Repressor der Differenzierung in der frühen kardialen Entwicklung, vermag demnach möglicherweise, proliferative Stadien der Zelle zu erhalten. Es wurde das gleiche methodische Prinzip wie unter Punkt 3.5 beschrieben, genutzt. Eine c-kit(-)-Population aus der jeweils selben Isolation der c-kit(+)-Zellen wurde als Kontrolle genutzt. Die Real-Time-PCR der gewonnenen cDNA zeigte folgende Ergebnisse: im Vergleich zu der Expression in den c-kit-negativen Zellen konnte für c-myc eine signifikante, 1,9-fache Erhöhung des Expressionsniveaus in der c-kit-positiven Population gemessen werden. Tbx-3 war ebenfalls signifikant um den Faktor 2,4 in der positiven Population erhöht (Abbildung 10).

Expression von Tbx3 in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen



Expression von c-myc in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen

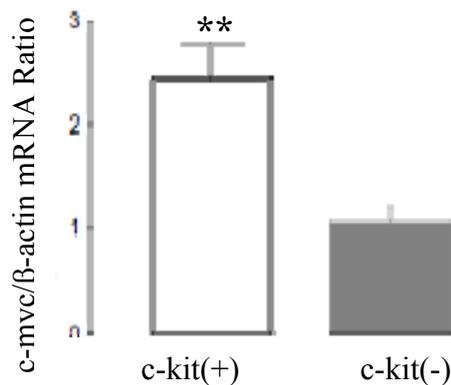


Abbildung 10: Real-Time PCR von c-myc und Tbx3. Expression in c-kit(+)-Zellen und c-kit(-)-Zellen. **Oben:** Tbx3 in c-kit positiver Population 2,0-fach erhöht. **Unten:** c-myc in c-kit positiver Population 2,3-fach erhöht. Expression mit dem Haushaltsgen β -actin verglichen. n=4, **P<0,001 Versus c-kit(-)-Zellpopulation.

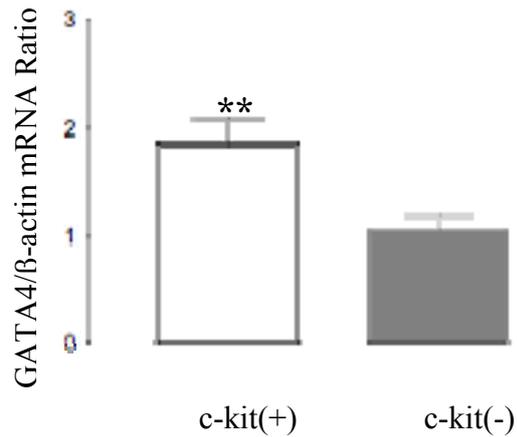
3.6 c-kit(+)-Population exprimiert Marker früher kardialer Entwicklung

Da sich gezeigt hatte, dass beide Rezeptoren in der c-kit(+)-Zellpopulation exprimiert werden, wurde der Versuch einer weiteren Charakterisierung dieser Zellen, deren molekulare Eigenschaften kaum erforscht sind, unternommen. Zu diesem Zweck wurden Marker ausgewählt, die in mesodermalen Zellen über die Entwicklung in frühe kardiale Vorstufen entscheiden, wie GATA-4 und NOTCH-2. Sie sind demnach in den Eintritt in eine kardiale Differenzierung impliziert. Als Kontrolle wurde die unter Punkt 3.5 ebenfalls beschriebene FACS-sortierte c-kit(-)-Population ausgewählt. GATA-4 fand sich im Vergleich zu der c-kit-negativen Population in c-kit(+)-Zellen um 1,8-fach erhöht. NOTCH-2 war ebenfalls in beiden Populationen präsent und wies eine um das 3,1-fache erhöhte Expression in der c-kit(+)-Zellpopulation auf (Abbildung 11).

Wie unter Punkt 1.6.1 ausführlich beschrieben, ist eine ungestörte Expression von GATA-4 und NOTCH-2 in der frühen kardialen Entwicklung unabdingbar für die Differenzierung

mesenchymaler Vorläuferzellen in Kardiomyozyten sowie glatter Muskelzellen des kardialen Ausflusstraktes.

Expression von GATA-4 in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen



Expression von NOTCH2 in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen

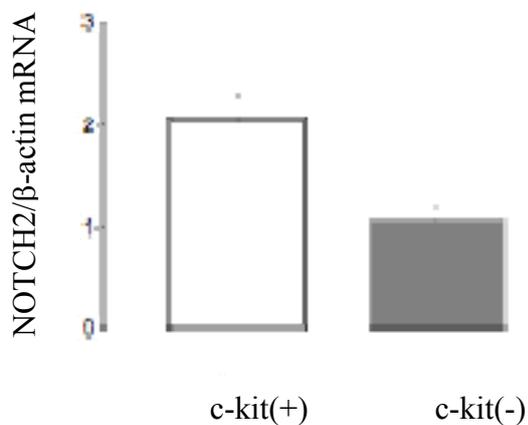


Abbildung 11: Real-Time PCR der frühen kardialen Marker GATA-4 und NOTCH-2. Expression in c-kit(+)-Zellen und c-kit(-)-Zellen. **Oben:** GATA-4 in c-kit positiver Population 1,8-fach erhöht. **Unten:** NOTCH-2 in c-kit positiver Population 2,0-fach erhöht. Expression mit dem Haushaltsgen β-actin verglichen. n=4, *P<0,05 versus c-kit(-)-Zellpopulation. **P<0.001 versus c-kit(-)-Zellpopulation.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass aus dem Herzen isolierte Zellen, die Stammzellmarker aufweisen, ebenfalls Transkriptionsfaktoren exprimieren, die potenzielle Faktoren für eine Differenzierung in kardiale Zelltypen sind.

3.7 Überlebens-Signalwege in c-kit(+)-Zellen: Akt und STAT3

Zwei weitere Moleküle, deren Expression untersucht wurde, sind Akt und STAT3. Beide haben wichtige Schlüsselpositionen in der Vermittlung von Signalen innerhalb der Zelle. Über unterschiedliche Kaskaden vermögen sie es, apoptotische Signale zu hemmen und damit das Überleben der Zelle zu ermöglichen. Die Untersuchung der ubiquitär vorkommenden Kinase Akt durch Real-Time-PCR ergab eine signifikante, um 1,8-fach erhöhte Expression in c-kit(+)-Zellen. Als Kontrolle diente eine der gleichen Isolation entstammende c-kit(-)-Population. Hingegen fand sich in beiden Populationen kein Unterschied zwischen den Expressionsniveaus von STAT3 (Abbildung 12 a und b).

Expression von Akt in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen

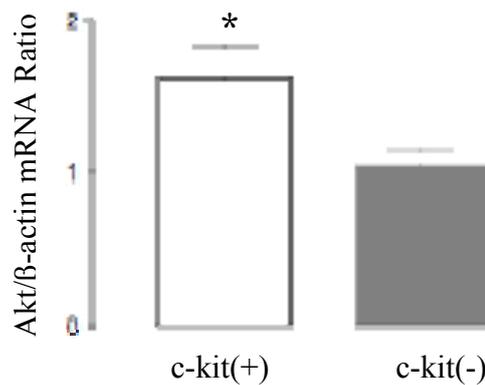


Abbildung 12 a: Real-Time PCR von Akt. Expression in c-kit(+)-Zellen und c-kit(-)-Zellen. **Links:** Akt in c-kit positiver Population 1,8-fach erhöht. n=4, *P<0,05 versus c-kit(-)-Zellpopulation.

Expression von STAT3 in c-kit(+)- Zellen und c-kit(-)- Zellen aus AMI Herzen

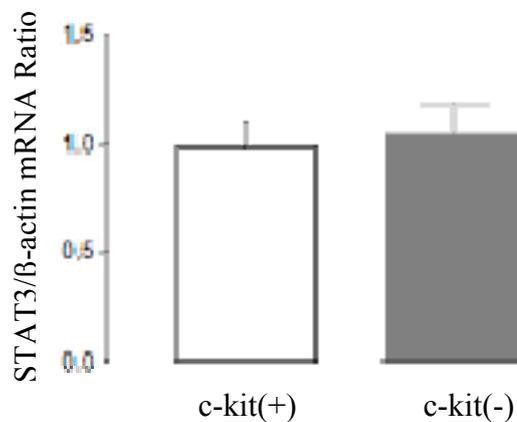
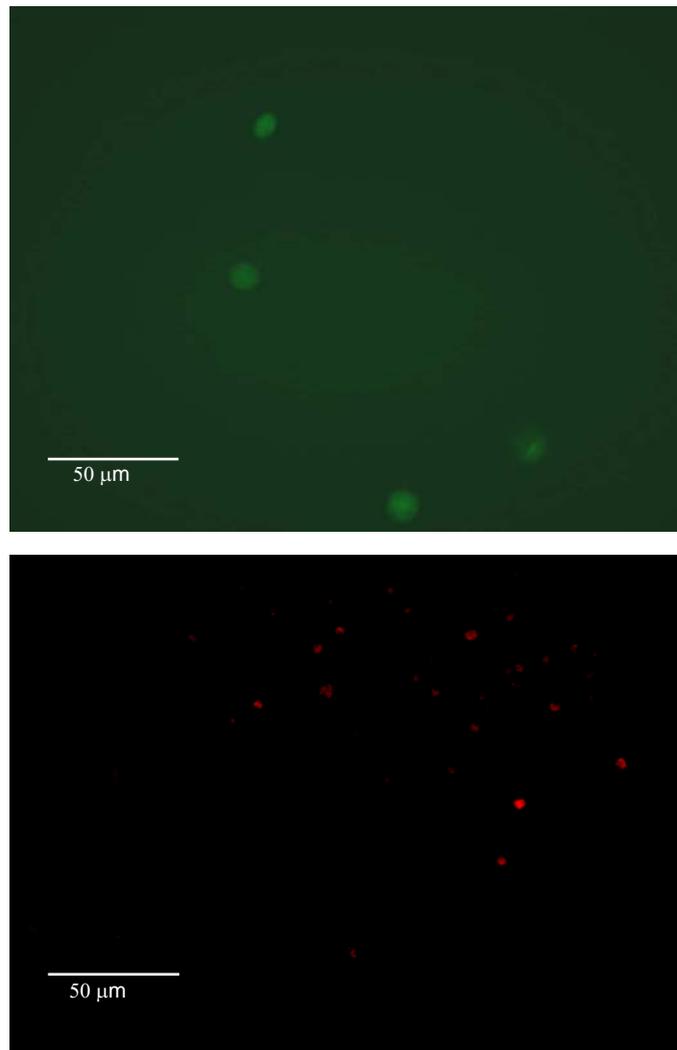


Abbildung 12 b: Real-Time PCR von STAT3: kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen c-kit positiver und c-kit negativer Population. Expression mit dem Haushaltsgen β -actin verglichen. n=4, *P<0,05 versus c-kit(-)-Zellpopulation.

3.8 Funktionelle Relevanz von ER α in der Entwicklung von H9C2-Zellen

Es galt nun, die funktionelle Rolle von ER α auf die Differenzierungs- und Proliferationseigenschaften der Zelle zu untersuchen. Wie unter Punkt 1.5 ausgeführt, besitzt diese Zelllinie embryonischer Kardiomyoblasten die Fakultät, von einem undifferenzierten Stadium in ein differenziertes Myozytenstadium überzutreten, bietet somit die Möglichkeit, die Wirkungen einer Substanz wie E2 auf die Polarität Differenzierung versus Proliferation zu analysieren.

Um zu bestätigen, dass der ER α in allen Stadien der Differenzierung exprimiert wird, wurden Immunofluoreszenz-Färbungen vorgenommen. Zudem wurden das undifferenzierte Stadium der Kardiomyoblasten durch eine Färbung mit alkalischer Phosphatase (AP) dargestellt. In ihrem differenzierten Zustand exprimieren H9c2 Zellen Proteine reifer Kardiomyozyten wie α -sarkomerisches Aktin, was in Abbildung 13 ebenfalls dargestellt ist.



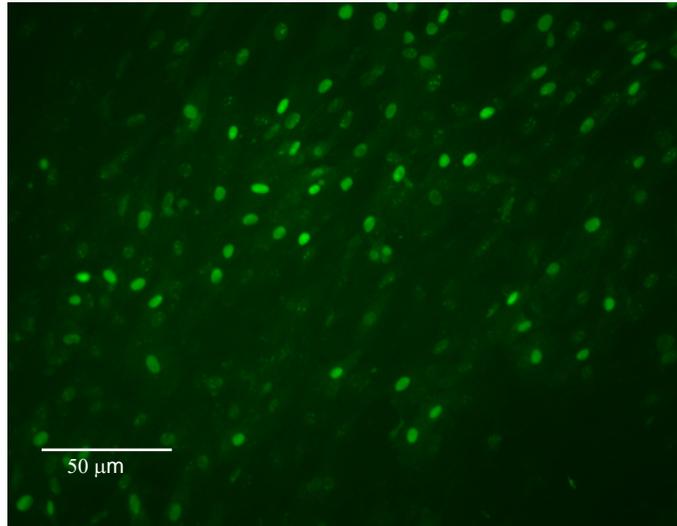
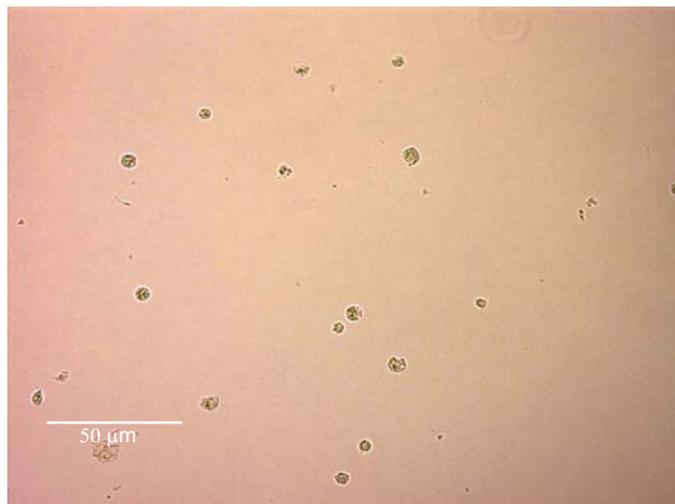


Abbildung 13a: Immunfluoreszenz-Färbung und Alkalische-Phosphatase-Färbung in H9c2-Zellen. 400-fach. **Oben:** H9c2 in undifferenzierter, „runder“ Form mit ER α positiven Nuklei = grün. **Mitte:** H9c2 im Übergangsstadium mit alkalischer Phosphatase-Färbung. **Unten:** Differenziertes Stadium der H9c2-Zellen. ER α -Expression=grün.



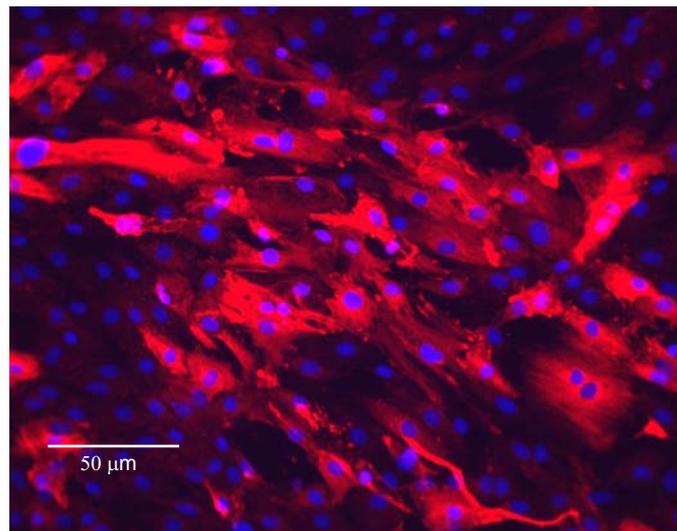
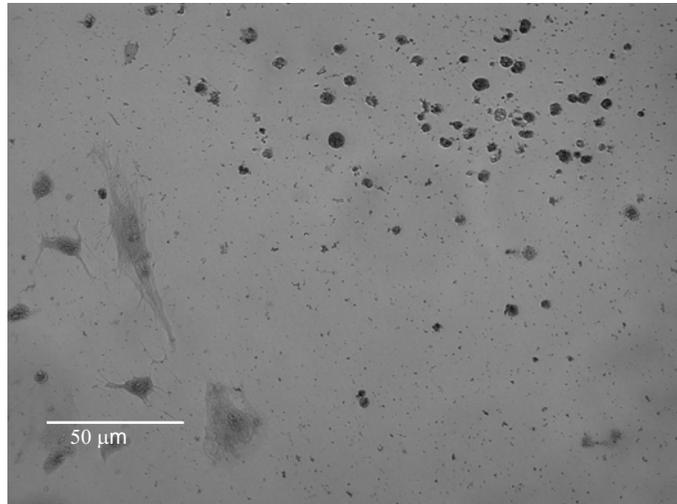
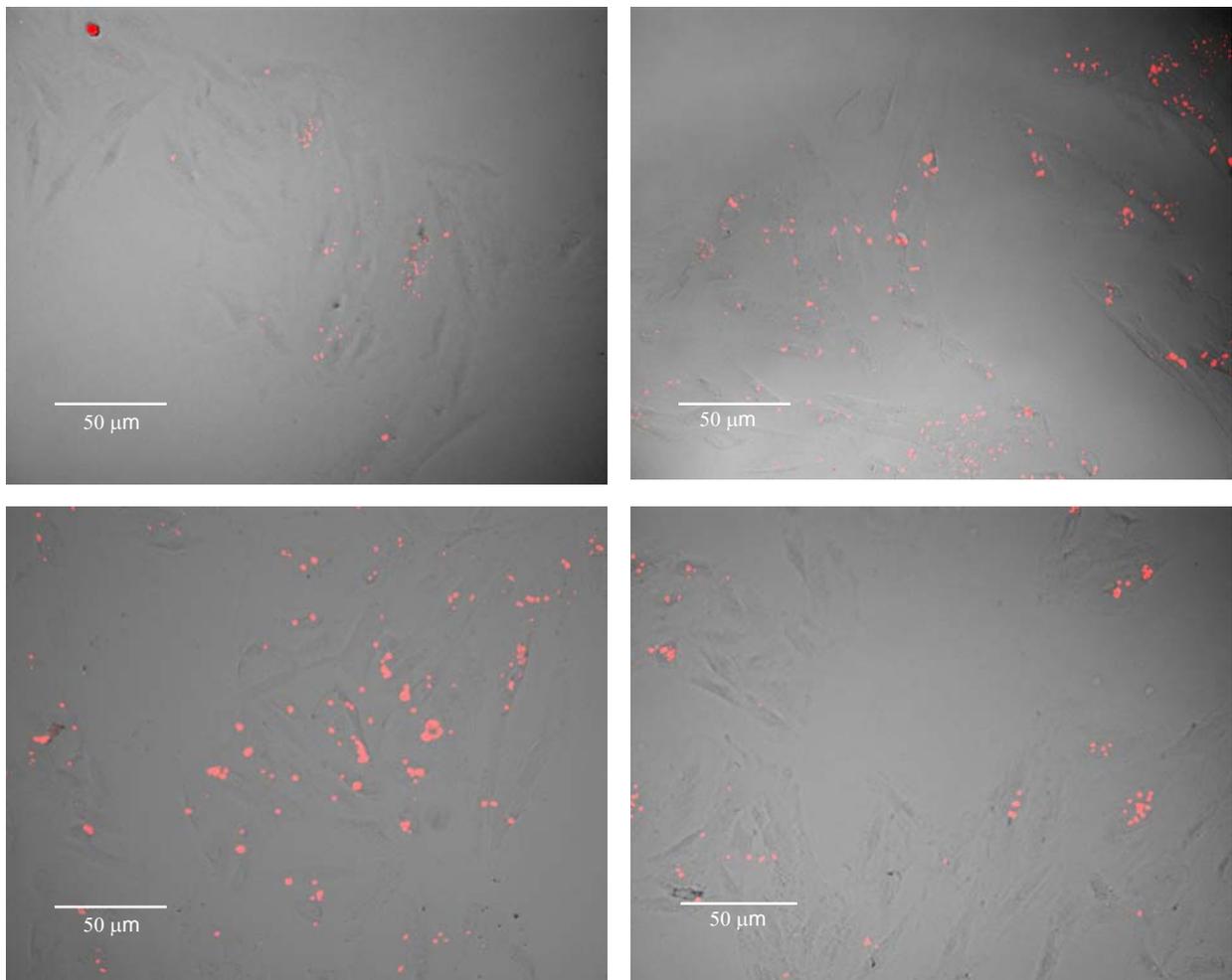


Abbildung 13b: Immunfluoreszenz-Färbung und Alkalische-Phosphatase-Färbung in H9c2-Zellen. **Oben:** Phase-Kontrast-Bild der Blastenform. **Mitte:** Phase-Kontrast-Bild der H9c2 im Übergangsstadium. **Unten:** α -sarkomerisches Aktin = rot, Kernfärbung = Dapi = blau.

H9c2 Zellen, die mit 10%FBS kultiviert werden, behalten zu einem Großteil ihre undifferenzierte, „runde“ Form bei (Abbildung 13b, Oben). Ein Teil der Kultur bleibt zunächst in einem proliferativen Stadium, während sich manche Zellen zu Kardiomyozyten differenzieren (Abbildung 13 b Mitte). Dies zeigt sich auch durch die Enzymaktivität der AP, die lediglich in mitotisch aktiven Zellen präsent ist; die im Phase-Kontrast-Bild als differenzierte, adhärenente Zellen mit Ausläufern erscheinenden H9c2 Zellen weisen keine

Aktivität AP auf (Abbildung 13a+b, Mitte). Zudem konnte bestätigt werden, dass H9c2-Zellen im Zuge ihrer Differenzierung durchgehend den ER α exprimieren (Abbildung 13a, Links und Rechts).

Um den E2-Einfluss auf Differenzierung und Proliferation in den H9c2 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen ohne Zusatz von FBS oder anderen Nährmitteln 24 Stunden kultiviert, wonach die Stimulation mit E2, PPT und DPN erfolgte. Als Kontrolle diente eine wurden unbehandelte H9c2-Zellen mitgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen gezählt und mit dem AP-Detektions Kit behandelt.



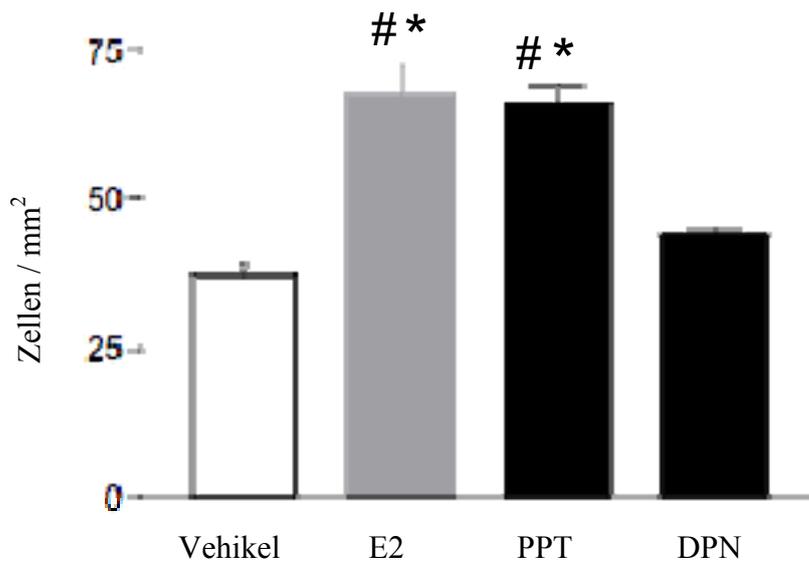


Abbildung 14: Alkalische Phosphatase in H9c2-Zellen. **Oben Links:** Negativkontrolle. **Oben Rechts:** Stimulation mit E2 (1 nM?). **Unten Links:** Stimulation mit PPT (10 nM). **Unten Rechts:** Stimulation mit DPN (10 nM). **Ganz Unten:** Graphische Darstellung der AP+-H9c2. n=6 *P<0,01 versus Negativkontrolle. #P<0,01 versus DPN.

Der Bildteil von Abbildung 14 zeigt, dass die unbehandelten H9c2-Zellen sich zu einem beträchtlichen Teil differenzieren, ca. 40 Zellen/mm² waren in proliferativen Prozessen begriffen, daher positiv für die AP (Links oben). 48 Stunden nach der Stimulation mit E2 zeigte sich eine 1,8-fach erhöhte Proliferation in den H9c2 Zellen (Rechts Oben). Die durch den ER α -Agonisten PPT stimulierte zeigte zum gleichen Zeitpunkt eine um das 1,7-fach erhöhte Zellvermehrung (Links unten). Die Stimulation mit DPN ergibt keine signifikante Regulation der Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle. Dieses Verhältnis ist in der Graphik im unteren Teil von Abbildung 14 dargestellt und bildet die durch Zellzählung ermittelte Menge an A P-positiven Zellen ab.

Ein weiterer Hinweis auf die Rolle von E2 in der Entwicklung kardialer Zellen zeigte sich in der Abhängigkeit der GATA4-Expression gegenüber der E2 Konzentration. Es wurden vier verschiedene Konzentrationen von E2 ausgewählt und hergestellt (0,1nM, 1nM, 3nM, 10nM). Unbehandelte H9c2 dienten als Negativkontrolle. Der für die Differenzierung insbesondere kardialer Zellen unerlässliche Transkriptionsfaktor GATA4 zeigte in der Negativkontrolle die höchste Expression. Diese wurde in der Gestalt einer Dosis-Wirkungs-Kurve abhängig von der E2-Dosis herabreguliert (Abbildung 15).

Die Wirkung von E2 in H9c2-Zellen im Sinne einer Hemmung ihrer Differenzierung wird mit großer Wahrscheinlichkeit über den ER α vermittelt. Wie in Abbildung 15 gezeigt, besteht eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der E2-Konzentration und der GATA4-Expression. Die Behandlung der H9c2-Zellen mit dem ER α -Agonisten PPT in 1nM Konzentration bewirkte eine Reduktion der GATA4-Expression auf 34,2%, während die Behandlung mit 3nM E2 eine Reduktion der Expression auf 43,7% bewirkte (Abbildung 16).

E2 dosisabhängige Expression von GATA4 in H9c2-Kardiomyoblasten

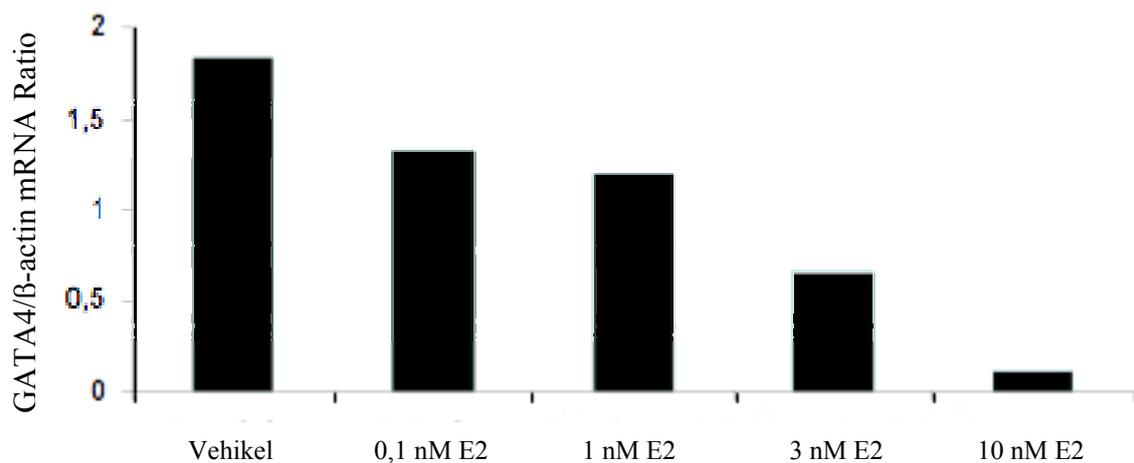


Abbildung 15: Abhängigkeit der GATA4-Expression von der angewendeten E2-Dosis. Vehikel = unbehandelte Negativkontrolle.

Effekt von E2 und PPT auf die GATA4 Expression in H9c2 Kardiomyoblasten

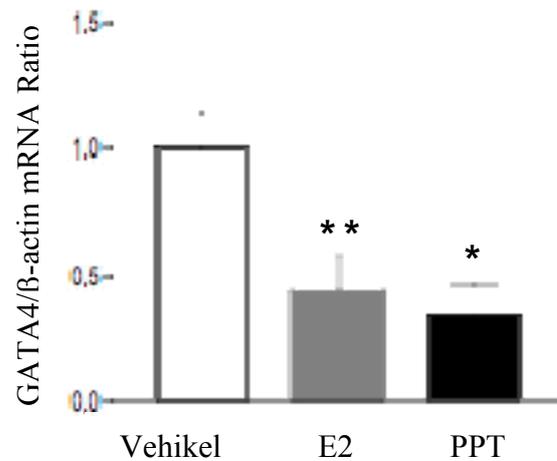


Abbildung 16: Real-Time-PCR-Analyse des kardialen Differenzierungs-Transkriptionsfaktors GATA4 in H9c2-Zellen. n=6, *P<0,05 versus Negativkontrolle (Vehikel). **P<0,001 versus Negativkontrolle (Vehikel).

Um eine Aussage zu treffen, ob die verstärkte Proliferation in den H9c2-Zellen als alleiniges Resultat der Stimulation durch E2 und seinen ER α -Agonisten zu verstehen war, wurde erneut H9c2-Myoblasten in 96-Well Platten ausgesät. Um die Spezifität der Wirkung von E2 und PPT zu überprüfen, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden mit 3nM E2 und dem unspezifischen Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 behandelt. Eine unbehandelte Negativkontrolle wurde mitgeführt. Die Zellen wurden nach Beendigung der Stimulation mit Calcein – einem Farbstoff der vitale Zellen von toten Zellen differenziert - gefärbt und gezählt.

Östrogenrezeptoren unterstützen das Zellüberleben

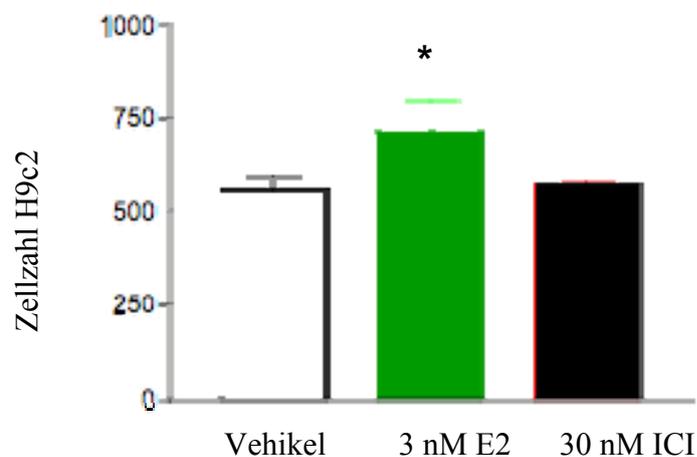


Abbildung 17: Zellzählung Calcein-positiver Zellen: **Links:** Negativkontrolle. **Mitte:** E2-Behandlung (3nM). **Rechts:** E2-Behandlung + Blockierung beider ER's mit dem Antagonisten ICI 137 589 (30 nM). n=4, *P<0,05 versus Negativkontrolle.

Abbildung 17 zeigt die Steigerung der proliferativen Prozesse in H9c2-Myoblasten durch E2 anhand einer Calcein-Färbung. Dieser Effekt konnte durch ICI nahezu vollständig blockiert werden. Der Anstieg der Proliferation in Kardiomyoblasten ist daher höchstwahrscheinlich ein spezifischer Effekt von E2.

3.9 Die Rolle von E2 in Differenzierungs- und Proliferationsgenen in der H9c2-Zelllinie

Die Effekte von E2 und den spezifischen Agonisten seiner Rezeptoren auf weitere in die Entwicklung und das Überleben von H9c2-Zellen involvierte Gene wurden in einer weiteren Versuchsreihe durch Real-Time-PCR untersucht.

Es konnte gezeigt werden (Patten RD et al. 2004) dass E2 die Expression der antiapoptotisch wirksamen Akt-Kinase in verschiedenen Zellen des kardiovaskulären Systems zu steigern vermag. Dieser Effekt lässt sich ebenfalls in H9c2-Zellen bestätigen. Nach 48 Stunden Stimulation durch E2 zeigte sich eine erhöhte Akt-mRNA-Konzentration (Abbildung 17)

Effekt von E2 auf Akt-Expression in H9c2 Kardiomyoblasten

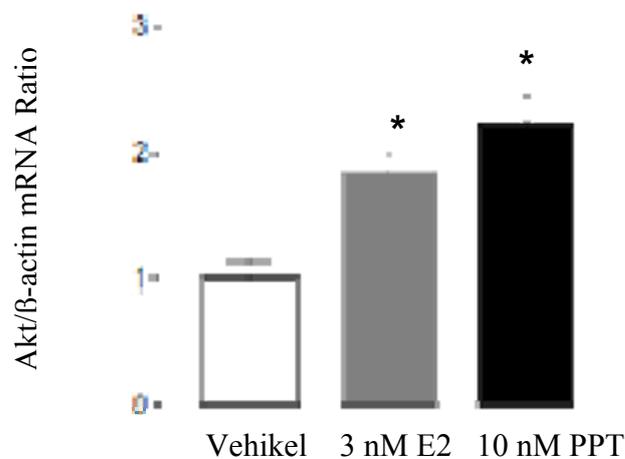


Abbildung 17: Expression der Akt-Kinase in H9c2-Kardiomyoblasten. **Weiß:** Vehikel-Behandlung: basale Akt-Expression. **Grau:** E2-Behandlung: 1,8 fache Erhöhung verglichen mit Negativ. **Schwarz:**

Behandlung mit PPT: 2,2fache Erhöhung verglichen mit Vehikel. n=4, *P<0,05 versus Negativkontrolle.

Der stärkste Effekt zeigte sich bei einer 3nM Konzentration durch eine 1,8-fache Erhöhung der Expression von Akt im Vergleich zur Vehikel-Substanz. Für PPT wurde eine 1nM Konzentration gewählt. Die Stimulation mit PPT führte zu einem 2,2-fach erhöhten Expressionsniveau von Akt. DPN (nicht gezeigt) führte zu keiner signifikanten Änderung der Akt-Expression.

Ein weiteres Gen, das durch die Stimulation mit E2 durch den ER α in H9c2-Zellen reguliert wird, ist Tbx-3. Verglichen mit der Behandlung durch das Vehikel Dextrin (in 3nM Konzentration) wurde unter der Behandlung mit 3nM E2 eine 2,4-fache Erhöhung der Genexpression in H9c2-Zellen festgestellt. Eine 2,2-fache Erhöhung der Tbx-3-Genexpression zeigte sich nach der Stimulation mit PPT (Abbildung 18).

Effekt von E2 auf Tbx-3-Expression in H9c2 Kardiomyoblasten

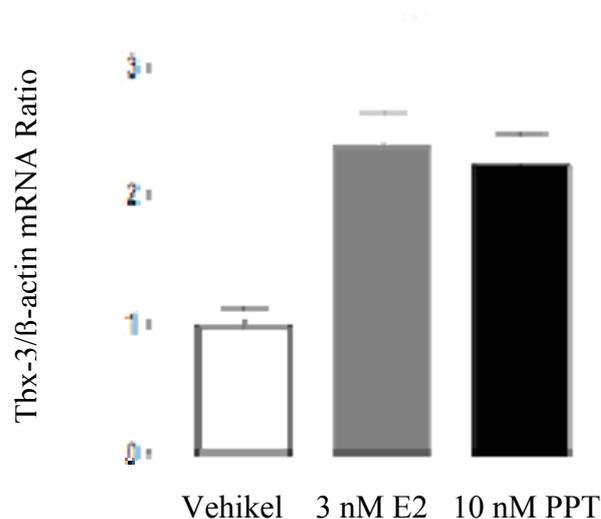


Abbildung 18: Expression von Tbx-3 in H9c2-Kardiomyoblasten. **Weiß:** Vehikel-Behandlung: basale Tbx-3 Expression. **Grau:** E2-Behandlung: 1,8 fache Erhöhung verglichen mit Vehikel-Behandlung. **Schwarz:** Behandlung mit PPT: 2,2fache Erhöhung verglichen mit Vehikel. n=4, *P<0,05 versus Negativkontrolle

Östrogene bestimmen demnach das Schicksal der H9c2-Myoblasten durch zwei wichtige Mechanismen: sie wirken hemmend auf das Gen GATA4, das maßgeblich an der

Differenzierung der Zelle beteiligt ist und erhöhen das Expressionsniveau von Genen, die in proliferativen, differenzierungshemmenden Prozessen involviert sind.

3.10 17-beta-Östradiol reduziert durch seine Wirkung auf den ER α Apoptose in Kardiomyozyten in Co-Kultur mit c-kit(+)-Zellen

Um die Funktion der c-kit(+)-Zellen im postischämischen Herzen zu verstehen, wurden aus AMI-Rattenherzen gewonnene Kardiomyozyten (KM) gemeinsam mit c-kit(+)-Zellen in eine Kultur gegeben. Insbesondere die Wirkung der Östrogene auf die c-kit(+)-Zellen sollte untersucht werden.

Es wurde ein Versuch mit insgesamt vier verschiedentlich behandelten Gruppen entworfen: eine Negativkontrolle ohne Behandlung, E2 (1nM), PPT (10nM), und DPN (10nM). Durch die FACS-Analyse wurde eine Zellpopulation aus dem Rattenherzen isoliert und angereichert, die als gemeinsamen Marker c-kit exprimierten (c-kit(+)-Zellen), sowie eine Population sortiert, die negativ für c-kit war (c-kit(-)-Zellen). In der Zellkultur wurden den Kardiomyozyten der einen Gruppe c-kit+ -Zellen beigefügt, die andere Gruppe der Kardiomyozyten wurde mit c-kit(-)-Zellen gemeinsam kultiviert. 24 Stunden nach der Isolation durch die FACS-Analyse wurde Hungermedium auf die Zellen gegeben, um mögliche Einflüsse auf Proliferation und Apoptose durch FBS ausschließen zu können. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Stimulation mit den oben genannten Substanzen. Nach einer Inkubationszeit von wiederum 24 Stunden wurde die Apoptose in den Kardiomyozyten durch das Fluorescein FragEL DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem, Deutschland) gemessen. Die Kardiomyozyten wurden durch eine Immunfluoreszenz-Färbung mit α -sarkomerischem Aktin detektiert.

Apoptose von Kardiomyozyten wird ER α -vermittelt reduziert

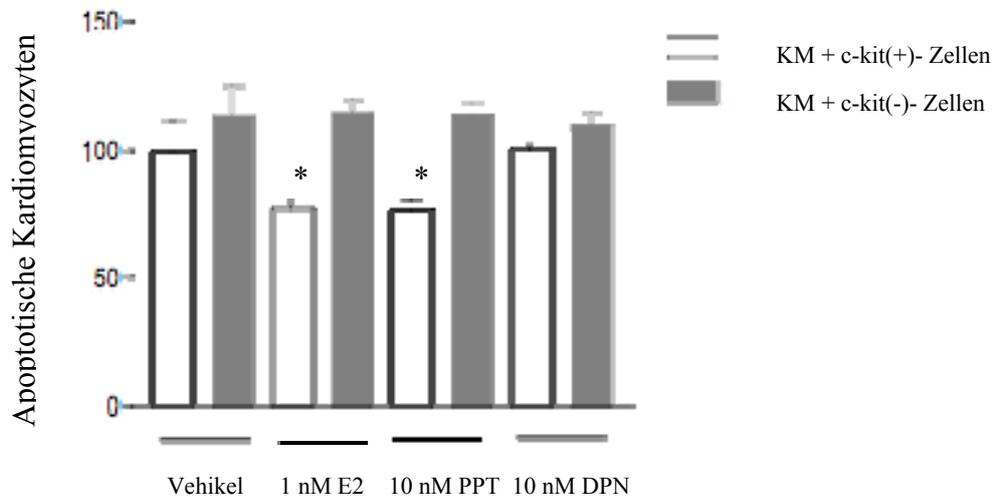


Abbildung 19: Apoptose Messung durch TUNEL-Methode in einer Ko-Kultur von Kardiomyozyten (KM) und c-kit⁺-Zellen verglichen mit einer Ko-Kultur von Kardiomyozyten und c-kit⁻-Zellen. Vehikel = Negativkontrolle. Stimulation 1nM E2, 100nM PPT, 100nM DPN. n=6, *P<0,05 versus c-kit⁻-Zellen.

Die Zellzählung der apoptotischen Kardiomyozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab in der aus Kardiomyozyten und c-kit⁻-Zellen bestehenden Ko-Kultur keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Die Anzahl an apoptotischen Kardiomyozyten wies im Vergleich keine besonderen Unterschiede auf. In der Kokultur von Kardiomyozyten und c-kit⁺-Zellen hingegen, wurde eine signifikante Reduktion der Apoptose in den mit 1nM E2 (auf 77,2%) und 10nM PPT (auf 76,5%) stimulierten Gruppen verzeichnet ($p < 0,05$) (Abbildung 19). Die Behandlung der c-kit⁺ Kokultur mit DPN zeigte keine signifikante Reduktion der Apoptose in Kardiomyozyten, was auf einen ER α -vermittelten Effekt hinweist.

3.11 17-beta-Östradiol unterstützt durch seine Wirkung auf den ER α das Überleben von Kardiomyozyten in Co-Kultur mit c-kit⁺-Zellen

In einem gleichen Versuchsansatz und unter gleichen Bedingungen wie unter 3.11 beschrieben, wurde die Anzahl überlebender Kardiomyozyten untersucht. Hier wurde eine einfache Calcein-Färbung gewählt, die lebende Zellen detektiert und unter Fluoreszenzlicht sichtbar macht. Wie unter 3.11 wurden nur Kardiomyozyten gezählt. In Abbildung 20 ist zu

sehen, dass in der Ko-Kultur von Kardiomyozyten und c-kit(-)-Zellen keine signifikanten Unterschiede der Anzahl überlebender Kardiomyozyten zu verzeichnen waren.

ER α unterstützt das Überleben von Kardiomyozyten

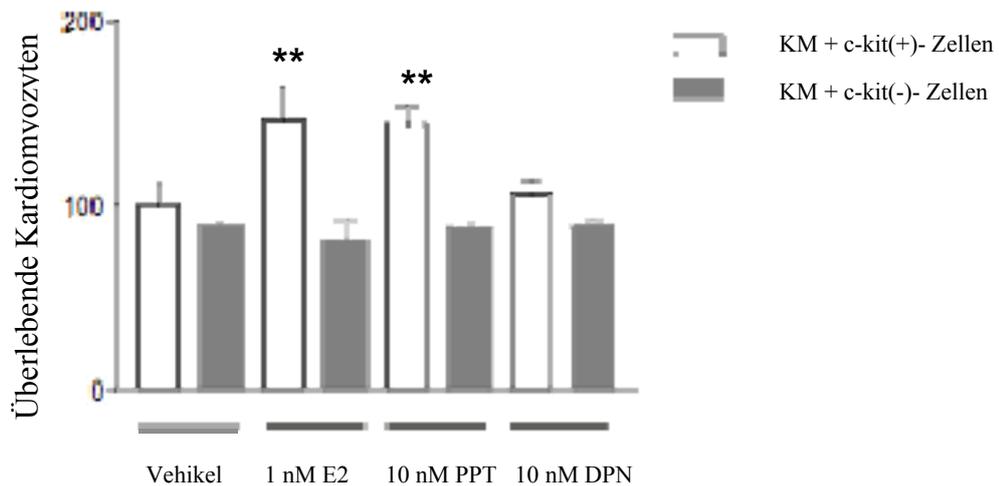


Abbildung 20: Messung überlebender Kardiomyozyten (KM) durch Calcein-Färbung in einer Ko-Kultur von Kardiomyozyten und c-kit⁺-Zellen verglichen mit einer Ko-Kultur von Kardiomyozyten und c-kit⁻-Zellen. Vehikel = Negativkontrolle. Stimulation mit 1nM E2, 10nM PPT, 10nM DPN. n=6, **P<0,01 versus c-kit⁺-Zellen.

In der c-kit⁺-Ko-Kultur ergab die Behandlung mit 1nM E2 eine signifikant erhöhte Anzahl Calcein⁺-Kardiomyozyten (auf 14,7%). Die spezifische Aktivierung des ER α mit 10 nM PPT erhöhte das Überleben der Kardiomyozyten ebenfalls signifikant. Die Stimulation der Ko-Kultur mit DPN zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Zellzahl überlebender Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontroll-Kultur (c-kit⁺-Zellen und Kardiomyozyten ohne Behandlung = Vehikel).

3.12 Kardiale c-kit⁺-Zellen induzieren nach Stimulation mit PPT Proliferation in einer Ko-Kultur mit H9c2-Kardiomyoblasten

Um einen möglichen parakrinen Effekt der c-kit⁺-Zellen auf das Überleben /Proliferation in Zellen kardialen Ursprungs näher zu untersuchen, wurde eine Kultur c-kit⁺-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 10nM PPT stimuliert. Daraufhin wurde das Stimulationsmedium entfernt, durch Hungermedium ersetzt und die c-kit⁺-Zellen für weitere

24 Stunden kultiviert. In einem nächsten Schritt wurden $1,5 \times 10^3$ H9c2-Kardiomyoblasten/Well zu den c-kit⁺-Zellen hinzugefügt und als Ko-Kultur in Hungermedium über 24 Stunden kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurde mit dem unter Punkt 13.9 erwähnten Alkaline Phosphatase Detection Kit die Proliferation in H9c2-Zellen gemessen. In der Negativkontrolle wurde eine Proliferationsrate von 18,7% gemessen, während im Vergleich hierzu in der mit PPT vorbehandelten Ko-Kultur eine signifikant erhöhte Proliferation von 34,2% aufgezeichnet wurde (* P<0,01 vs. Vehicle) (Abbildung 21).

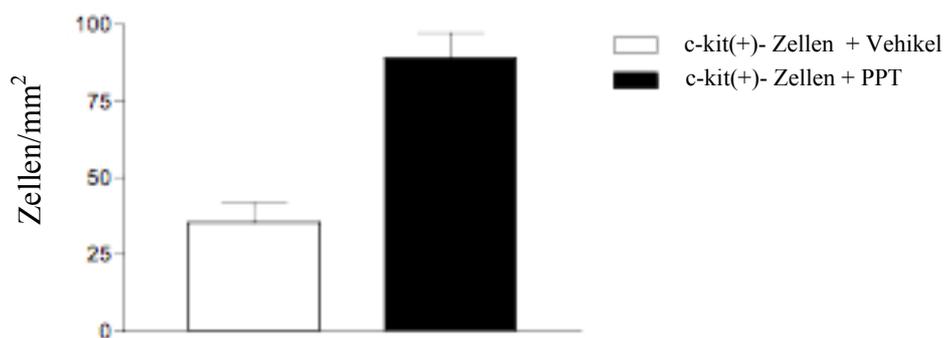
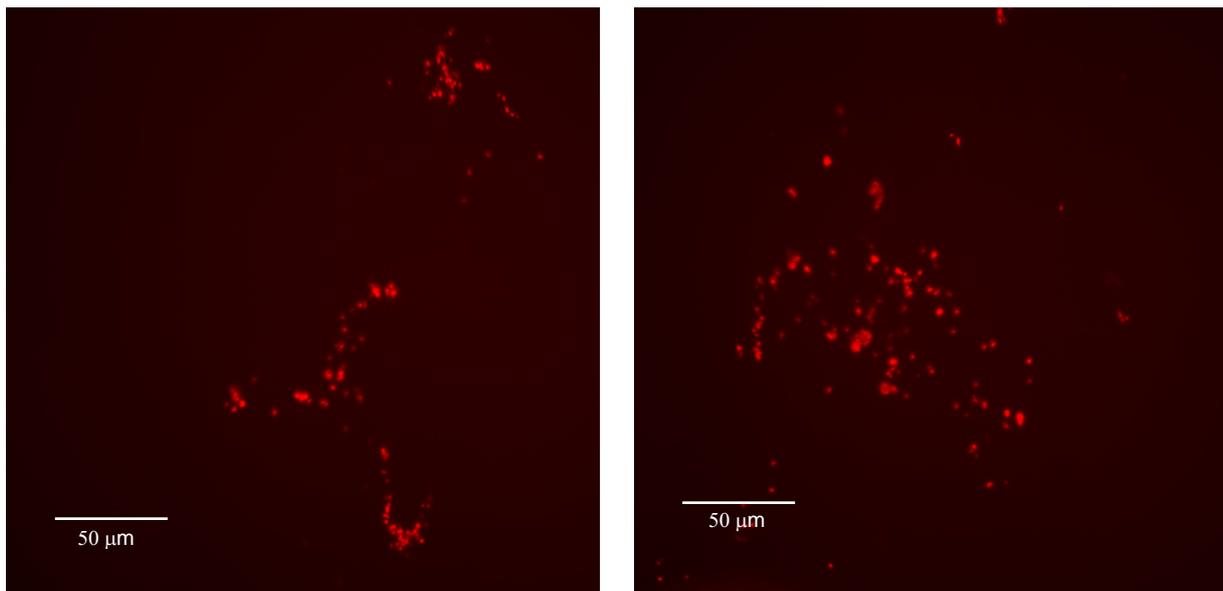


Abbildung 21: Alkaline Phosphatase-positive H9c2 in einer Kokultur mit prästimulierten c-kit⁺-Zellen. Vehikel = Negativkontrolle. n=5, *P<0,05 versus Negativkontrolle.

3.13 Die Präsenz des c-kit-Rezeptors auf kardialen pluripotenten Zellen ist die Voraussetzung für eine ER α /PPT-abhängige Proliferation der H9c2-Kardiomyoblasten.

Es galt nun, den Stellenwert einer Präsenz der c-kit⁺-Zellen im Überleben der Kardiomyozyten zu hinterfragen. Hierzu wurden eine durch die FACS-Analyse sortierte c-

kit(-)-Population sortiert und in gleicher Konzentration wie eine ebenfalls FACS-sortierte c-kit(+)-Population ausgesät.

Es erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit 10nM PPT beider Kulturen. Als Negativkontrolle wurde je eine c-kit(-)-Kultur und eine c-kit(+)-Kultur ohne Behandlung mitgeführt. Nach vollendeter Stimulation wurden jeder Kultur $1,5 \times 10^3$ H9c2-Kardiomyoblasten hinzugefügt, nachdem zuvor das Stimulations- durch „Hungermedium“ ersetzt worden war.

Nach weiteren 24 Stunden wurde die Proliferation anhand der Aktivität der Alkalinen Phosphatase gemessen. Es zeigte sich verglichen zu der unbehandelten H9c2-Kardiomyoblasten/c-kit(+)-Kokultur eine signifikant erhöhte Proliferation der H9c2-Kardiomyoblasten in der Kokultur mit den zuvor durch 10nM PPT stimulierten c-kit(+)-Zellen aus ($n=7$ (* $P < 0,01$ vs. Vehicle)). Die mit PPT behandelte H9c2-Kardiomyoblasten/c-kit(-)-Kokultur sowohl als auch die mit Vehikel behandelte H9c2-Kardiomyoblasten/c-kit(-)-Kokultur zeigten keine signifikanten Unterschied in der Proliferation (Abb. 22).

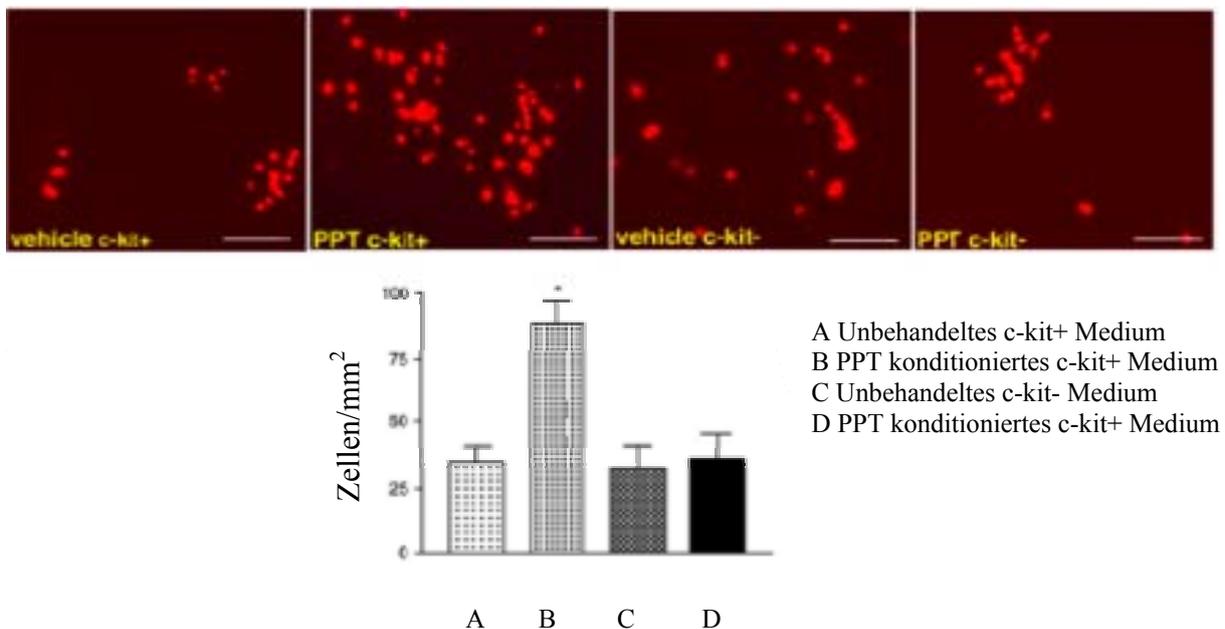


Abb. 22: Signifikante Erhöhung der Proliferation von H9c2-Kardiomyoblasten in Kokultur mit im Vorfeld durch 10nM PPT stimulierte c-kit(+)-Zellen. Keine Signifikanz der Proliferation in unbehandelten Kokulturen sowie in im Vorfeld durch 10nM PPT stimulierte c-kit(-)-Zellen. $n=7$, * $P < 0,001$ versus Überstand von c-kit(+)-Zellen ohne Behandlung (= Vehikel), versus Überstand unbehandelter c-kit(-)-Zellen, versus Überstand mit PPT behandelte c-kit(-)-Zellen.

3.14 Die parakrine Hypothese: Proliferation von H9c2-Kardiomyoblasten unter Behandlung mit dem Überstand prästimulierter c-kit+-Zellen mit PPT

In einem dritten, auf die gleiche Fragestellung hinzielenden Versuch, wurde ebenfalls eine Kultur c-kit+-Zellen mit dem ER α -Agonisten PPT (10nM) stimuliert. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und durch Hungermedium ersetzt; eine Monokultur mit H9c2-Kardiomyoblasten wurde nach weiteren 24 Stunden mit dem nunmehr konditionierten Medium der prästimulierten c-kit+-Zellen behandelt (H9c2-Überstand-PPT). Schließlich wurde die Proliferation der H9c2-Zellen durch das Alkaline Phosphatase Detection Kit gemessen. Die H9c2-Überstand-PPT zeigten eine Proliferationsrate von 38 % verglichen mit der Negativkontrolle, die eine Proliferationsrate von 17 % aufwies (* P<0,01 vs. Vehicle). Ein Hinweis darauf, dass die Aktivierung von ER α in c-kit+-Zellen einen wahrscheinlich parakrin stimulierenden Effekt auf die Proliferation von undifferenzierten kardialen Zellen hat (Abbildung 23).

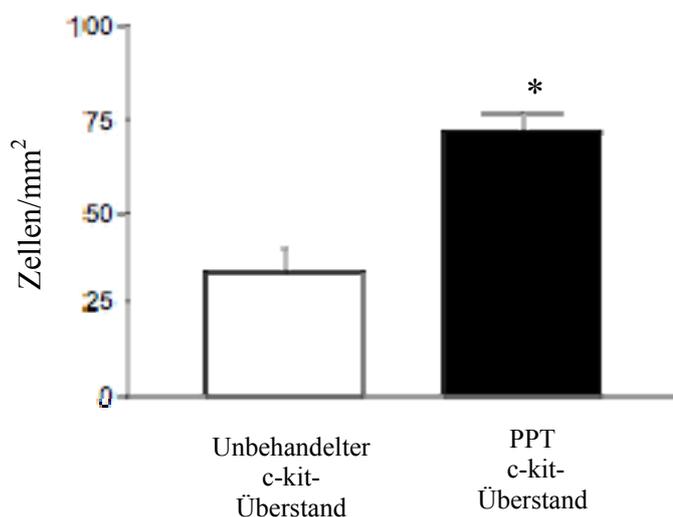
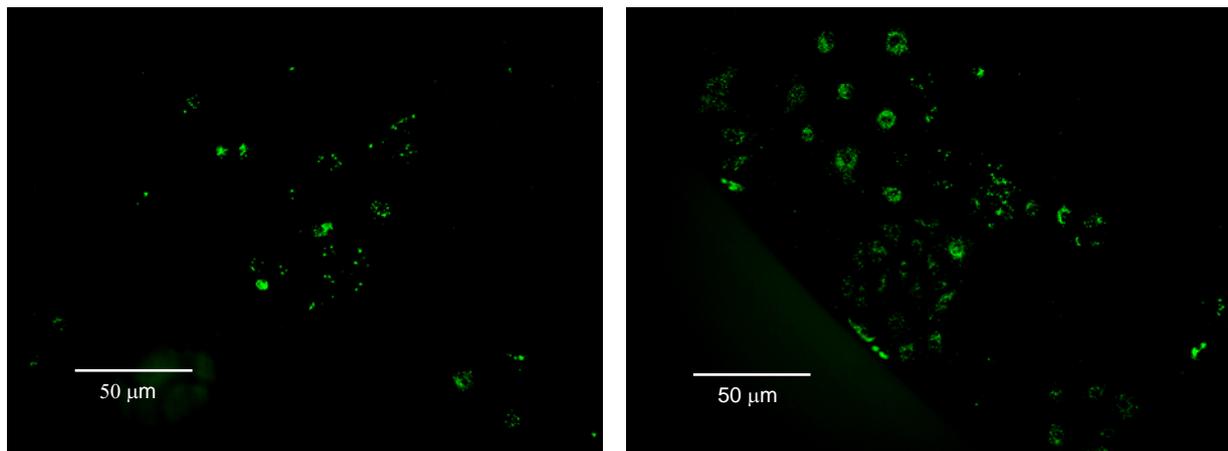


Abbildung 23: Alkaline Phosphatase-positive H9c2 in einer mit Überstand von prästimulierten c-kit+-Zellen behandelten Monokultur. n=5, p<0,05 versus unbehandelten Zellen (Negativkontrolle).

4 Diskussion

4.1 Erläuterung zu einigen methodischen Aspekten

4.1.1 Zur Wahl des Tiermodells

Um die Effekte der Stimulation des ER α in ex-vivo isolierten c-kit(+)-Zellen auf Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde die Induktion des Myokardinfarktes in männlichen Ratten vorgenommen und vor Beginn der Versuche in eine Sham- und eine AMI- Gruppe randomisiert. Die Wahl des Tiermodells begründet sich auf der Tatsache, dass der Verlauf der Koronararterien – ausgenommen einiger Variationen – ähnlich dem des Menschen ist. Zudem besteht sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte nur eine geringe Tendenz zur Ausbildung von Kollateralkreisläufen im koronaren Gefäßbett, so dass in beiden Spezies die Ausbildung großer transmuraler Infarkte ähnlich ausgeprägt ist. Die im Versuch vorgesehene operative Induktion eines akuten Myokardinfarktes wurde durch eine permanente Ligatur der LAD vorgenommen. Sieben Tage nach dem Eingriff wurden die Tiere erneut narkotisiert und die Herzen zur Gewebe- und Zellisolation entnommen.

Verschiedene Gründe liegen der Wahl männlicher Ratten für dieses Projekt zugrunde: zwar sind die KHK sowie der AMI Erkrankungen, die beide Geschlechter betreffen, doch sind Männer häufig früher betroffen und besitzen durch ihre niedrigeren Östrogenspiegel weniger protektive Mechanismen im Vergleich zu Frauen vor der Menopause. Verschiedene Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass Männer von Östrogen-vermittelten kardioprotektiven Mechanismen profitieren (Blumenthal RS et al. 1997, Mendelsohn ME et al. 1999, Arnlov J et al. 2006). Diese Arbeit soll einen dieser Aspekte untersuchen.

Zudem schließen sich praktische Gründe für die Wahl männlicher Tiere an. Zunächst konnten hiermit unerwünschte Nebeneffekte möglicher endogener Östrogenquellen minimiert werden. Außerdem konnte durch die Wahl männlicher Tiere das zusätzliche Operationsrisiko- und Trauma einer Ovariectomie ausgeschlossen werden.

4.1.2 Induktion des AMI in Wistar Ratten: zum zeitlichen Versuchsaufbau

Das Zeitschema der Induktion eines AMI in adulten Wistar Ratten wurde nach dem Modell von Johns und Ohlsen (1954, siehe Punkt 2.2.2.2) durchgeführt. Die Wahl des Zeitpunktes zur Entnahme der Herzen begründet sich auf der Überlegung, dass nach sieben Tagen im Infarktgebiet ein Schlüsselmoment in mehrer Hinsicht erreicht ist. Zum einen beginnt ein fibrotischer Prozess durch einwandernde Fibrozyten, dessen Ausmaß über die Größe der nicht-funktionellen Narbe und damit über die post-infarzielle Herzfunktion entscheidet. Zudem spielen myokardiale Fibroblasten bei der Induktion des kardialen Remodelings eine wichtige Rolle. Der Begriff des myokardialen Remodelings umschreibt als strukturelle Veränderung des Herzens die Folge eines Ungleichgewichts zwischen dem Abbau der extrazellulären Matrix und der Inhibition ihres Abbaus. Hinzu kommen Prozesse wie Apoptose und Nekrose die gemeinsam mit dem Abbau der Extrazellulärmatrix zu einer herabgesetzten Herzfunktion führen.

Zeitgleich interagieren eingewanderte Lymphozyten als Endglied einer mehrphasigen Entzündungsreaktion (Riede U et al. 2004), die wenige Minuten nach dem Eintritt des AMI beginnt, mit Kardiomyozyten und anderen Zellen des Herzparenchyms. Sie schütten proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-8) aus und vergrößern damit den Infarkttradius auch mehrere Tage nach dem eigentlichen Infarkt ereignis (Nian M et al. 2004). Ursprünglich wurde daher der Zeitpunkt der Herzisolation zu diesem „entscheidenden Moment“ als sinnvoll angesehen und daher dort gewählt. Während *in vitro* Kultivierung der c-kit(+)-Zellen zeigten sich geringe Proliferationsraten, sodass ein Zeitraum von 7 Tagen zudem geeignet schien, einen erhöhten Gewinn an c-kit(+)-Zellen in der Isolation zu erhalten. Zu einem früheren Zeitpunkt wäre die Zellzahl möglicherweise geringer, zu einem späteren Zeitpunkt wäre die Fibrosierung des Infarktgebiets stärker ausgeprägt gewesen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 ER α in Proliferation versus Differenzierung

c-kit(+)-Zellen aus dem AMI- Herzen charakterisieren sich sowohl durch ihre proliferativen Eigenschaften als auch durch die Expression von Genen der frühen kardialen Entwicklung (Beltrami AP et al. 2003). Stammzellen, die zu Muskelzellen transdifferenziert wurden, weisen geschlechtsspezifische Unterschiede auf, die sich darin ausdrücken, dass weibliche

Zellen geringere Differenzierungstendenzen aufweisen, so dass Proliferation und Expansion im Gegensatz zu männlichen Zellen vorherrschen (Deasy BM et al. 2007).

Ein Teil dieser Arbeit zeigt in diesem Zusammenhang die proliferative Wirkung von E2 sowie die Hemmung kardialer Differenzierungsgene wie GATA-4 in kardialen Myoblasten. Dass sich dieser Effekt mit dem ER α -Agonisten PPT reproduzieren lässt, spricht für eine Vermittlung über den ER α . Dies trifft auch für NOTCH-2 zu, welches durch Stimulation des ER α in H9c2-Kardiomyoblasten herabreguliert wurde.

Die pro-proliferativen Effekte des ER α werden in anderen Zelltypen wie glatten Muskelzellen und neonatalen Kardiomyozyten über die Akt-Kinase vermittelt (Patten RD et al. 2004, Montague CR et al. 2004). In den in dieser Arbeit untersuchten H9c2 Kardiomyoblasten steigerte eine Stimulation mit E2 und PPT ebenfalls die Akt Expression. Die proliferationssteigernden Effekte des ER α konnten mit dem unspezifischen ER-Blocker ICI 185 684 gehemmt werden.

Ein weiterer Hinweis auf die Funktion des ER α in H9c2 Zellen ergab sich in der Messung der Genexpression von c-myc und Tbx3. Die Verstärkung der Expression zeigte sich mit E2 Behandlung sowie durch Zugabe von PPT, wird also - konsistent mit der ihm zugeschriebenen pro-Proliferationsrolle - durch den ER α vermittelt.

Ein wichtiges Molekül in einem weiteren „Überlebens-Signalweg“ vieler Zellen ist das Protein STAT3. In der Kardiomyoblasten-Zelllinie war die Expression dieses Signalprotein durch E2, PPT und DPN nicht beeinflusst.

4.2.2 H9c2-Kardiomyoblasten: Zur Wahl des Modells

Die Wahl der H9c2-Sekundärzelllinie wurde aus zwei Gründen getroffen. Die Ausbeute der c-kit(+)-Zellen war gering, so dass sich große Stimationsversuche in der Zellkultur mit anschließender Real-Time-Analyse als unmöglich erwiesen. Die Zahl der in der FACS-Analyse gewonnenen reinen c-kit+-Zellen aus AMI-Herzen lag bei $2,1 \pm 0,7 \times 10^5$ lebenden Zellen, es bestand daher die Möglichkeit zu Zellkulturexperimenten mit geringen Zellzahlen und zu molekularen Analysen, die jedoch die gesamte Ausbeute einer Isolation erforderten.

Zudem wurde ein Modell benötigt, in dem molekulare Analysen unter E2-Stimulation an einer großen Anzahl von Zellen möglich waren. Hier sollte vor allem die Frage im Vordergrund stehen, welche Effekte Östrogene in c-kit(+)-Zellen möglicherweise ausüben. In diesem Zusammenhang war vor allem nach einer eventuellen Induktion von Proliferation versus der Aktivierung von Differenzierung durch Östrogene ein wichtiger Aspekt.

Zunächst wurden diese Fragen vor dem Hintergrund eines angestrebten Differenzierungsversuches durch Östrogene in H9c2-Myoblasten gestellt. Weiterhin sollte untersucht werden, durch welchen beider Rezeptoren mögliche Effekte auf das Zellschicksal ausgeübt werden.

Die H9c2 Zelllinie stellt, wie unter den Punkten 1.5 und 3.9 beschrieben, durch ihre Fähigkeit von einem undifferenzierten Stadium mit hohem Nukleus/Zytoplasma Quotienten in ein differenziertes Stadium übergehen zu können, einen idealen Rahmen für Differenzierungs- und Proliferationsassays dar. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie aus einem kardialen Kontext stammt, jedoch in einem undifferenzierten Blastenzustand existieren kann und somit ein Bindeglied zwischen den undifferenzierten c-kit(+)-Zellen und einem möglichen kardial differenzierten Zustand bilden können.

4.2.3 Molekulare Merkmale der c-kit(+)-Zellen und mögliche Ursprünge

Die verstärkte Expression des ER α in der c-kit(+)-Zellpopulation bestätigte sich in der Real-Time PCR. Dass der ER β keine signifikante Expressionsänderung im Vergleich zu den c-kit(-)-Zellen aufweist, spiegelt das Ergebnis der Proteinmessung im Western Blot wieder.

Die c-kit(+)-Zellen exprimierten frühe Marker kardialer Entwicklung (GATA-4 und NOTCH-2). Die Tatsache, dass Zellen aus dem Herzen isoliert worden waren, musste nicht gleichbedeutend mit ihrem Ursprung sein. Eine Immigration von Stamm- und Progenitorzellen anderer Gewebe, wie zum Beispiel dem Knochenmark war ebenso möglich. Die Expression zweier Transkriptionsfaktoren, die in der Entstehung des Herzens eine tragende Rolle spielen, deutet möglicherweise daraufhin, dass die isolierte c-kit(+)-Population zu einem Reservoir kardialer Stammzellen gehörte. Das Ziel dieser Arbeit war es jedoch nicht, den genauen Herkunftsort der c-kit(+)-Zellen zu bestimmen, sondern ihre Funktion nach dem AMI zu beschreiben.

Ein wichtiges Merkmal einer Stammzelle ist ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation, der so genannten Immortalisierung. Die Expression des Protoonkogens c-myc sowie Tbx3 in der c-kit(+)-Zellpopulation, die im Vergleich zu Zellen des umliegenden Gewebes (c-kit(-)-Zellen) signifikant erhöht war, unterstrich die Stammzelleigenschaft dieses Zelltyps.

Die Assoziation des Akt-P13-Signalwegs und seiner Aktivierung durch E2 ist in verschiedenen Zelltypen - unter anderem in Kardiomyozyten - beschrieben worden. Dieser Effekt wird unter anderem über den ER α vermittelt (Booth EA et al. 2003). Das Expressionsniveau der Akt-Kinase zeigte sich in der c-kit+-Population signifikant erhöht.

4.2.4 Proliferative Rolle von E2 in c-kit+Zellen der Periinfarktzone

Ein erster Hinweis auf eine möglicherweise bedeutende Rolle des ER α nach einem akuten AMI zeigte sich in der Western Blot Analyse. Die erhöhte Konzentration des ER α Proteins wiesen, wenn auch nicht auf den zellulären Ursprung dieser Erhöhung, so doch auf eine Funktion des ER α unmittelbar im Randbereich des Infarktes hin, die es zu lokalisieren galt.

Die Tatsache, dass der ER β keine signifikante Konzentrationsdifferenz zwischen Sham und AMI Gruppe zeigte, kann im Sinne der von Gustaffson und Lindberg (Lindberg MK et al. 2003) aufgestellten *ying und yang Theorie* nach der die beiden ER's in vielen Geweben und molekularen Kontexten komplementäre Funktionen einnehmen, gesehen werden.

Die Schnitte aus der Infarkt- und Periinfarktzone wurden daraufhin mit Doppel- oder Dreifachfärbungen untersucht (ER α + Zellmarker / BrdU + Dapi), um die Lokalisation und eine mögliche Überexpression des ER α zu untersuchen. Der ER α ist im kardiovaskulären System fast ubiquitär vorhanden (Booth EA et al. 2003), in Kardiomyozyten spielt er eine tragende Rolle in Hypertrophierungsprozessen (Mahmoodzadeh S et al. 2006) und in Vascular Smooth Muscle Cells trägt er durch Aktivierung der NO-Synthase zur Relaxation des Gefäßes bei, um nur wenige seiner vielfältigen Funktionen zu nennen. Die in den Schnitten der Periinfarktzone Anti-BrdU+ Zellen waren in doppelter Hinsicht interessant. Sie zeigten die Präsenz proliferierender Zellen, die aufgrund ihres Aspektes und Durchmessers keine Kardiomyozyten waren und eine im Gegensatz zum umliegenden Gewebe erhöhtes Signal für den ER α .

Die Zellagglomerate, die eine Expression der Stammzellmarker c-kit und sca-1 aufwiesen, zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression des ER α .

Das erhöhte ER α -Signal in den c-kit(+)-Zellen unterstützte die Hypothese einer durch das ischämische Ereignis hervorgerufenen Überexpression des ER α in dieser Zellpopulation und somit einer möglichen Schlüsselrolle nach einem akuten AMI.

In einer Ko-Kultur mit H9c2 Zellen wirkten zuvor mit PPT stimulierte c-kit(+)-Zellen proliferativ auf die Kardiomyoblasten, was ebenfalls auf einen durch den ER α vermittelten parakrinen oder auf Zell-Zell-Kontakten basierenden Effekt hindeutet. Diese Beobachtungen sind konform mit den mehrfach beschriebenen proliferativen Eigenschaften des ER α in anderen Zelltypen (Haynes MP et al. 2000), weisen aber ebenfalls auf eine wichtige Rolle der c-kit(+)-Zellen im kardialen Kontext hin.

Um zu untersuchen, ob E2 tatsächlich über einen Stimulus in c-kit⁺-Zellen (ER α -vermittelt) Überlebensprozesse oder Proliferationsprozesse auf parakrinem Weg in kardialen Zellen induziert, mussten die c-kit⁺-Zellen separat mit E2 und den Agonisten seiner Rezeptoren stimuliert werden, um in einem anschließenden Schritt mit den H9c2-Kardiomyoblasten in einer Ko-Kultur aufgenommen zu werden. Die Ergebnisse einer 24h-Stimulation der Vorläuferzellen mit E2 und PPT, die einen proliferativen Effekt in H9c2-Zellen hervorruft, der unabhängig von einer Ko-Kultivierung, sondern durch konditioniertes Medium stattfindet, sprechen für pro-proliferative parakrine Eigenschaften der c-kit⁺-Zellen.

4.2.5 Eine mögliche protektive Rolle in c-kit(+)-Zellen durch ER α

Die jüngste Theorie auf dem Gebiet der kardialen Regeneration nach Myokardinfarkt ist die sogenannte „Parakrine Hypothese“; durch beobachtete, aber noch weitgehend unverstandene parakrine Effekte wirken in das Myokard transplantierte Zellen positiv auf das Überleben von Kardiomyozyten im Ischämiegebiet. Möglicherweise schaffen diese implantierten Stamm- oder Progenitorzellen verschiedener Gewebe durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein günstiges Milieu für die Angiogenese oder senden Überlebenssignale an gefährdete Kardiomyozyten und andere Zellen des kardialen Gewebes (Gnecchi M et al. 2008).

Es blieb nach wie vor die Frage, welche Funktion c-kit⁺-Zellen im kardialen Parenchym erfüllen. Eine Ko-Kultivierung schien ein geeigneter Weg für erste Erkenntnisse.

Die Kardiomyozyten, die für die Ko-Kultur mit den c-kit⁺- und c-kit⁻-Zellen genutzt wurden, stammten aus jeweils denselben Herzen, aus denen auch die Vorläuferzellen isoliert wurden. Dies geschah, um eventuelle Immunreaktionen zu vermeiden. Die c-kit⁻-Zellen, die als Kontrolle den Kardiomyozyten beigelegt waren, stammten ebenfalls aus jeweils denselben Herzen wie die Herzmuskelzellen. Sie waren Zellen, die den c-kit⁺-Zellen im Durchmesser ähneln, also um ein Vielfaches kleiner sind als Kardiomyozyten (ca. 5-10 μ m), die in der FACS-Analyse jedoch als nicht-c-kit-tragend identifiziert wurden. Somit konnte durch diese Kontrolle ausgeschlossen werden, dass ein Effekt über kardiale Stamm- oder Progenitorzellen auf Kardiomyozyten ausgeübt wird. Die Ergebnisse in der mit E2, PPT und DPN stimulierten c-kit⁻-Zellen/Kardiomyozyten-Kokultur zeigten nur geringe Abweichungen von der unbehandelten Kokultur, die Gabe von E2, PPT oder DPN hat in der

Präsenz von c-kit(-)-Zellen keinen Effekt auf apoptotische Vorgänge in Kardiomyozyten zu haben.

Um diese Rolle weiter zu charakterisieren wurde der Effekt einer Ko-Kultivierung c-kit(+)-Zellen mit Kardiomyozyten aus infarktierten Herzen anhand von apoptotischen Vorgängen und Überlebenszahlen der Kardiomyozyten gemessen. Gleichzeitig fand eine Ko-Kultivierung mit c-kit(-)-Zellen unter den gleichen Bedingungen statt. Durch Stimulation mit PPT zeigte sich eine Verringerung apoptotischer Kardiomyozyten in der c-kit(+)-Kultur, was darauf hindeutet, dass eine Aktivierung des ER α in c-kit(+)-Zellen über E2 oder seinen spezifischen Agonisten PPT vonnöten ist, um einen anti-apoptotischen Effekt auf Kardiomyozyten auszuüben. Die geringeren apoptotischen Kardiomyozytenzahlen in der c-kit(+)-Ko-Kultur unter E2 und PPT Behandlung deuteten auf einen direkten Effekt der c-kit(+)-Zellen auf Kardiomyozyten hin. Ein durch Zell-Zell-Kontakte von den c-kit(+)-Zellen vermitteltes und schließlich intrazellulär in den Kardiomyozyten fortgesetztes Überlebenssignal wäre ebenso denkbar wie die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren auf parakrinem Weg.

Unter denselben Versuchsbedingungen zeigte sich ein gesteigertes Überleben der Kardiomyozyten ebenfalls in einer Ko-Kultur mit c-kit(+)-Zellen, was ebenfalls auf eine über PPT und den ER α vermittelte protektive Funktion der c-kit(+)-Zellen in infarktierten Herzen hindeutet.

In einem in-vivo Kontext kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere kardioprotektive Mechanismen eine Rolle spielen, wie zum Beispiel das durch ER α vermittelte „Homing“ endothelialer Progenitorzellen, die nach Myokardinfarkt zu einer verbesserten kardialen Funktion führen (Hamada H et al. 2006). Auch die durch E2 über den in den Mitochondrien von Kardiomyozyten gelegenen ER β hervorgerufenen antioxidativen Schutzprozesse bei äußerem Stress können zu den antiapoptotischen Mechanismen gehören (Sato M et al. 2007, Yang SH et al. 2004, Sugishita K et al. 2003).

Nach der Entdeckung der c-kit(+)-Zellen war die Hoffnung zunächst auf ihre Transdifferenzierung in Zellen des kardialen Parenchyms gesetzt worden; die Differenzierung von Myozyten aus kardialen c-kit(+)-Zellen gelang (Urbanek K et al. 2003), dennoch konnte keine tragende Rolle bei der post-infarziellen Funktionsverbesserung des Herzens nachgewiesen werden. Vielmehr konnte eine Assoziation zwischen der Präsenz c-kit(+)-Zellen und der Schaffung eines positiven angiogenetischen Milieus gezeigt werden (Fazel S et al. 2006).

Gleichzeitig besteht anhand der gezeigten Ergebnisse die Möglichkeit eines durch den ER α auf c-kit(+)-Zellen vermittelten Schutzmechanismus für Kardiomyzyten nach AMI.

ER α unterstützt das Überleben von Kardiomyozyten nach AMI

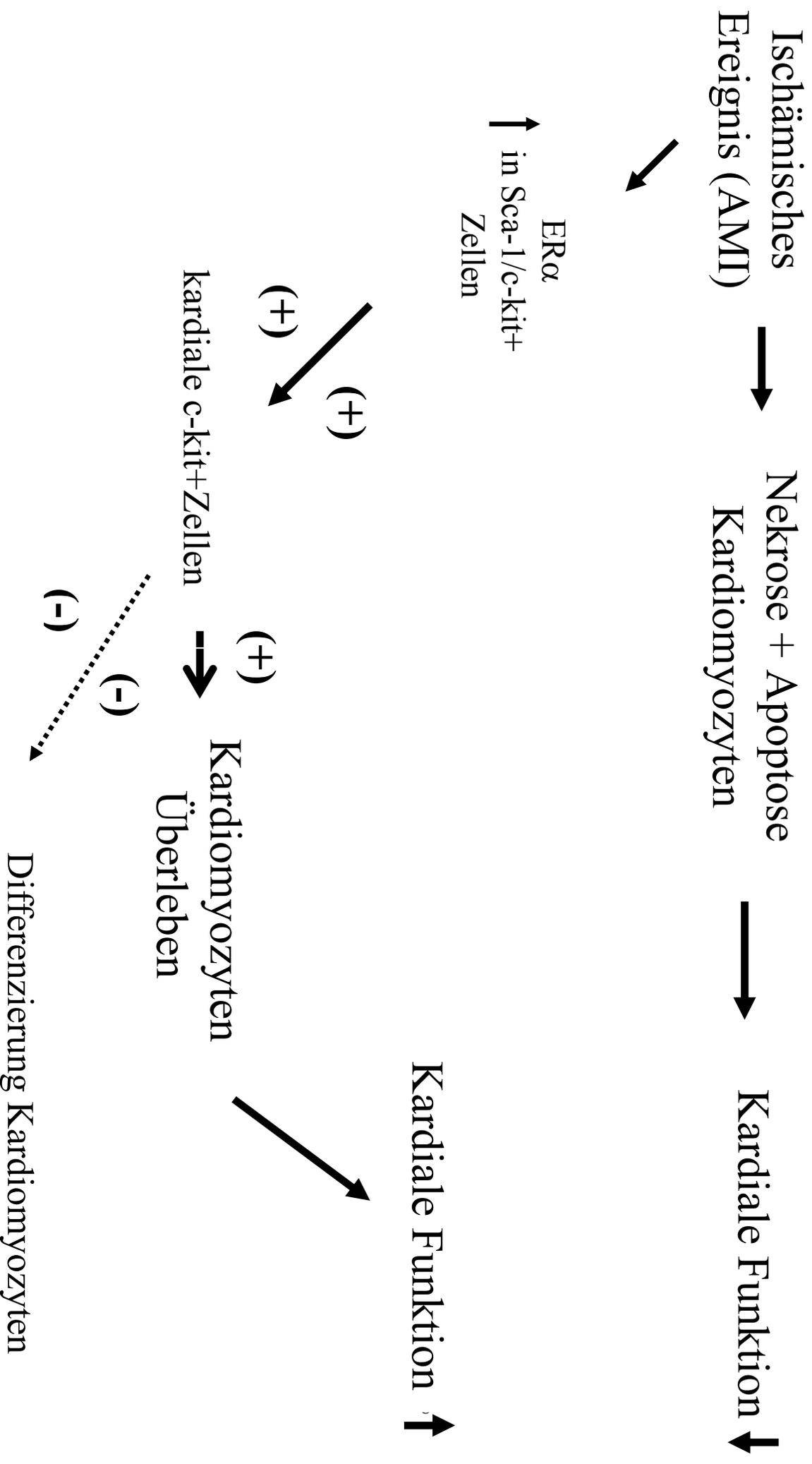


Abb. 24: Schaubild: ER α unterstützt nach AMI das Überleben von Kardiomyozyten über c-kit(+)-Zellen

5 Zusammenfassung und Ausblick

Trotz klinischer und experimenteller Daten, die eine kardioprotektive Rolle von Östrogenen via ihrem ER α gezeigt haben, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch wenig verstanden. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals einen Zusammenhang zwischen einem Östrogen-vermittelten Mechanismus in kardialen Stammzellen und positiven Effekten auf das Überleben von Kardiomyozyten. Sie beleuchtet somit einen frühen Teil der Postinfarktphase, der durch inflammatorische Vorgänge und den Beginn des sogenannten kardialen Remodelling gekennzeichnet ist.

Es konnte gezeigt werden, dass ER α während dieser Phase in c-kit(+)-Vorläuferzellen im Herzen verstärkt exprimiert wird und dass diese Zellen unter *in vitro* Bedingungen durch Östrogenstimulation, bzw. durch Stimulation des ER α proliferieren.

Auf molekularer Ebene wurden in diesen c-kit(+)-Vorläuferzellen eine Expression früher kardialer Gene beschrieben (GATA-4, NOTCH-2), sowie die Expression verschiedener Schlüsselmoleküle verschiedener Signalwege untersucht (Tbx3, STAT-3, Akt).

In H9c2-Kardiomyoblasten konnte durch E2 und seinen ER α eine Hemmung der Differenzierungsbestrebung der Zelle gezeigt werden.

In einer Ko-Kultur aus c-kit+Zellen und H9c2 Kardiomyoblasten war unter alleiniger Stimulation des ER α eine erhöhte Proliferation der Kardiomyoblasten zu beobachten. Dieser Effekt zeigte sich auch, wenn H9c2-Zellen mit „konditioniertem“ Medium von zuvor mit dem ER α -Agonisten PPT stimulierten c-kit+Zellen behandelt wurden.

In einer weiteren Ko-Kultur aus primär gewonnenen Kardiomyozyten und c-kit+Zellen nahm die Apoptose der ersteren durch Stimulation mit E2 und PPT ab. Der ER β -Agonist DPN zeigte keine signifikanten Tendenzen im Sinne einer Stimulation der Proliferation von H9c2-Kardiomyoblasten.

Ein potenzieller Schutzmechanismus des Herzens nach AMI mag schlussfolgernd wie folgt aussehen: nach dem akuten ischämischen Ereignis findet in dem vitalen Gebiet der Periinfarktzone ein Stimulus zur Proliferation c-kit(+)-Zellen statt. ER α , der in verschiedensten H9c2-Kardiomyoblasten proliferationssteigernd wirkt, wird in dieser Zellpopulation verstärkt exprimiert. Diese c-kit(+)-Zellen, obwohl quantitativ im kardialen Parenchym nicht ins Gewicht fallend, üben über parakrine Botenstoffe oder Zell-Kontakte anti-apoptotische Effekte auf die durch die Ischämie gefährdeten Kardiomyozyten aus. Dieser anti-apoptotische Effekt tritt nach Stimulation des ER α durch PPT auf c-kit(+)-Zellen auf.

Durch das vermehrte Überleben von Kardiomyozyten verkleinert sich der Gewebsdefekt und es kommt zu einer funktionalen Wiederherstellung des Myokards.

Der wichtigste Aspekt im klinischen Kontext ist die Untersuchung der parakrinen Funktion der c-kit⁺-Zellen und der Natur möglicher Botenstoffe. Dies wären mögliche hoffnungsvolle Ansätze für eine Verbesserung der Prognose vieler Patienten mit schweren Infarkten. Insbesondere, da die Gabe von Östrogenen mit Zurückhaltung gehandhabt werden sollte, ist die Identifikation einer oder mehrerer parakrin sezernierter Faktoren, die eine anti-apoptotische Wirkung in der Randzone des Infarktes ausüben, von großer Bedeutung.

Im klinischen Kontext wäre es ebenfalls interessant, die Wirkung selektiver ER α -Modulatoren zu untersuchen, da sich hier möglicherweise über ckit(+)-Zellen eine Verkleinerung des Infarktgebietes erzielen ließe.

Weiterhin wird *in vivo* zu untersuchen sein, ob die aus dem Herzen isolierten Vorläuferzellen ihre positiven Effekte im post-Infarkt-Herzen auch auf Vitalparameter wie die EF ausüben. Dies könnte ein erster Schritt zu einer klinischen Erprobung der c-kit(+)-Zellen sein.

6 Literaturverzeichnis

- 1 *Highlights on Health in Germany*. 2004, World Health Organization
- 2 *Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt*. 2006, Gesundheitsberichterstattung des Bundes
- 3 Schwanzenbbächer P, Kochsiek K. Koronare Herzerkrankung. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg.) *Innere Medizin*. 4. Auflage. München, Deutschland: Urban & Schwarzenberg, 1998: 1114 - 29
- 4 Drexler H, Riede U, Müntefering H. Herzinsuffizienz. In: Riede U, Werner M, Schäfer H (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Thieme Verlag, 2004: 466-47
- 5 Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Factors of Risk in the development of Coronary Heart Disease – six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50
- 6 Yamada Y, Identification of Genetic Factors and Development of Genetic Risk Diagnosis Systems for Cardiovascular Diseases and Stroke. *Circulation* 2006; 70: 1240-48
- 7 Doevendans PA, Wouter J, Spiering W, Molecular Genetics and Gene Expression in atherosclerosis. *IJCARD* 2001; 80: 161-172
- 8 Green S, Kumar V, Krust A, Structural and functional domains of Estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 751-8.
- 9 Becker-André M, André E, DeLamarter JF, Identification of Nuclear Receptor mRNAs by RT-PCR Amplification of conserved zinc-finger motif Sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194(3):1371-9
- 10 Giguere V, Yang N, Segui P, Identification of a new Class of Hormone Receptors. *Nature* 1988;331(6151):91-4
- 11 Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, A structural biologist's view of the Estrogen Receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 30: 261-8.
- 12 Kosztin D, Bishop T, Schulten, Binding of the Estrogen Receptor to DNA. The Role of Waters. *Biophysical Journal* 1997;73: 557-570
- 13 Flötotto T, Untersuchung alternativer Mechanismus der Genregulation durch Östrogenrezeptor-Isoformen. Inaugural-Dissertation 2001: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 14 Katzenellenbogen BS, Estrogen Receptors: Bioactivities and Interactions with Cell Signaling Pathways. *Biology of Reproduction* 1996;54:287-293

- 15 Dutertre M, Smith CL, Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator action,. J Pharmacol Exp Ther 2000; Nov:431-7
- 16 Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Dissecting Physiological Roles of Estrogen Receptor α and β with potent Selective Ligands from Structure-Based Design. Molecular Endocrinology 2004;18(7):1599-1609
- 17 Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Characterization of the Biological Roles of Estrogen Receptors α and β , in Estrogen Target Tissues *in vivo* through the use of an ER α selective Ligand. Endocrinology 2002;143:4172-77
- 18 Razandi M, Alton G, Pedram A, Identification of a Structural Determinant Necessary for the Localization and Function of Estrogen Receptor α at the Plasma Membrane. Molecular and Cellular Biology 2003; March 2003: 1633-1646
- 19 Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Effect of a single compound knockouts of ER α and ER β on mouse reproductive Phenotypes. Development 2000;127:4277-91
- 20 Booth EA, Obeid NR, Lucchesi R, Activation of ER α protects the *in vivo* Rabbit Heart from Ischemia-Reperfusion Injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289:2039-47
- 21 Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Estrogen improves Cardiac Recovery after Ischemia/Reperfusion by decreasing TNF- α . Cardiovascular Research 2006;69:836-844
- 22 Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Pyrazole Ligands: Structure Affinity/Activity Relationships and Estrogen Receptor- α -selective Agonists. J Med. Chem. 2000;43:4934-47
- 23 Chang EC, Cham T, Park SH, Estrogen Receptors α and β as Determinants of Gene Expression. Molecular Endocrinology 2008;22(5):1032-43
- 24 Gustafsson JA, Enmark E, Peltö-Huikko M, Cloning of a novel Receptor Expressed in Rat prostate and Ovary. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(12):5925-30
- 25 Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, ER β reduces ER α -regulated gene transcription, supporting a “ying yang” relationship between ER α and ER β in mice. Mol Endocrinol. 2003; 17(2): 203-8
- 26 Paech K, Webb P, Kuiper GG, Differential Ligand Activation of ER and ER at AP1 Sites. Science 1997;277(5331):1508-10
- 27 Keightley MC, Steroid Receptor Isoforms: exception or rule? Mol Cell Endocrinol. 1998;137: 1-5
- 28 Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, The complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor beta and its Heterodimerization with ER alpha *in vitro* and *in vivo*. Bioch and Bioph Res Comm 1998;243:122-26

- 29 Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Molecular Mechanisms of Estrogen Action: selective Ligands and Receptor Pharmacology. *JSBMB* 2000;74:279-285
- 30 Grendale GA, Edelstein S, Barrett-Connor E, Endogenous Sex Steroids and Bone Mineral density in older Women and Men: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 1997;12:1833-43
- 31 Shearman AM, Karasik D, Gruenthal KM, ER beta Polymorphisms are associated with Bone Mass in Women and Men: The Framingham Study. *J Bone Miner Res* 2004;19:773-81
- 32 Christian RC, Liu PY, Harrington S, Intimal ER β Expression, but not ER α Expression, is correlated with Coronary Calcification and atherosclerosis in pre- and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2713-20
- 33 Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, ER beta Potency-Selective Ligands: Structure-Activity Relationship Studies of Diarylpropionitriles and their Acetylene and Polar Analogues. *J Med Chem* 2001;44:4230-51
- 34 Sun J, Baudry J, Katzenellenbogen JA, Molecular Basis for the Subtype Discrimination of the ER β -selective Ligand, Diarylpropionitril. *Molecular Endocrinology* 2003;17(2):247-58
- 35 Bourdeau V, Deschênes J, Métivier R, Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinology* 2004;18:1411-27
- 36 Beato M, Chalepakis G, Schauer M, DNA regulatory Elements for Steroid Hormones. *J Steroid Biochem* 1989; 32:737-47
- 37 O'Malley BW, A life long search for the Molecular Pathways of Steroids Hormone Action. *Mol and Cell Biol.* 2005;19:1402-11
- 38 Marino M, Galluzzo Paola, Ascenzi P, Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Curr Genomics* 2006;7(8):497-508
- 39 McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Nuclear Receptor Coactivators: multiple Enzymes, multiple Complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;69:3-12
- 40 Augereau P, Badia E, Balaguer P, Negative regulation of Hormone Signaling by RIP-140. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102:51-9
- 41 Kim J, Levin ER, Estrogen signaling in the cardiovascular System. *Nucl Recept Signal* 2006;4:e013
- 42 Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Mechanism of Vascular Smooth Muscle Cell Relaxation by Estrogen in depolarized rat and mouse aorta. *Circ Res.* 1997;81(2):242-8
- 43 Leung S, Teoh H, Keung W, Non-genomic Vascular Actions of Female Sex-Hormones: Physiological Implication and Signaling Pathways. *Clin Exp Pharm Phys* 2007;34:822-826

- 44 Haynes MP, Sinha D, Russel KS, Membrane ER engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human Endothelial Cells. *Circ Res* 2000;87(8):677-82
- 45 Yager JD, Davidson NE, Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer, *N Engl J Med* 2006;354:270-82
- 46 Mendelsohn ME, Karas RH, The protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. *N Engl J Med* 1999;340(23):1801-11
- 45 Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, Heart ER α : distinct Membrane and nuclear distribution Patterns and Regulation by Estrogen. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41(3):496-510
- 46 Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Estrogen Receptor α up-regulation and Redistribution in Human Heart Failure. *FASEB J* 2006;20:926-34
- 47 Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Variable Expression of Estrogen Receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 1994;89:1501-10
- 48 Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, Estrogen Receptors activate Atrial Natriuretic Peptide in the Rat Heart. *PNAS* 2001;98(20):11765-11770
- 49 Booth EA, Marchesi M, Kilbourne EJ, 17 β -Estradiol as a Receptor mediated Cardioprotective Agent. *JPET* 2003;307:395-401
- 50 Sack MN, Rader DJ, Cannon RO 3rd, Estrogen and Inhibition of Oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994;343(8892):269-70.
- 51 Guerra S, Leri A, Wang X, Myocyte Death in the Failing Human Heart is Gender dependent. *Circ Res.* 1999;85(9):856-66
- 52 Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Apoptosis in the Failing Human Heart. *N Engl J Med.* 1997;336(16):1131-41
- 53 Kim JK, Pedram A, Razandi M, Estrogen prevents Cardiomyocyte Apoptosis through Inhibition of Reactive Oxygen Species and Differential Regulation of P38 Kinase Isoforms. *J Biol Chem* 2005;281(10):6760-6767
- 54 Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, 17- β -Estradiol Reduces Cardiomyocytes Apoptosis in vivo and in vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling. *Circ Res.* 2004;95:692-99
- 55 Adams KF, Sueta CA, Gheorghide M, Gender Differences in Survival in advanced Heart Failure. Insights from the FIRST study. *Circulation* 1999;99(14):1816-21
- 56 Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, The Use of Estrogens and Progestins and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *N Engl J Med* 1995;332:1589-93

- 57 Keller KB, Lemberg L, Estrogen plus Progestin, Benefits and Risks: the “Women’s Health Initiative” Trials. *Am J Crit. Care* 2005;14(2):157-60
- 58 Manson J, Hsia J, Johnson K, Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med* 2003;349(6):523-34
- 59 Hulley S, Grady D, Bush T, Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in postmenopausal Women. *JAMA* 1998;280:605-13
- 60 Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Postmenopausal hormonal Replacement Therapy: Scientific Review. *JAMA* 2002;288(7):872-81
- 61 Blumenthal RS, Heldman AW, Brinker JA, Acute effects of Conjugated Estrogens on Coronary Blood Flow Response to Acetylcholine in Men. *Am J Cardiol* 1997;80:1021-24
- 62 Ärnlov J, Pencina MJ, Amin S, Endogenous Sex Hormones and Cardiovascular Disease Incidence in Men. *Ann Intern Med* 2006; 145:176-184
- 63 Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Human proto-oncogene c-kit: a new Cell Surface Receptor Tyrosine-Kinase for an unidentified Ligand. *EMBO J* 1987;6(11):3341-51
- 64 Zsebo K, Williams DA, Geissler EN, Stem Cell Factor is encoded at the SI Locus of the Mouse and is the Ligand for the c-kit Tyrosin Kinase Receptor. *Cell* 1990;68:213-24
- 65 Nocka K, Buck J, Levi E, Candidate Ligand for c-kit transmembrane Kinase Receptor: KL, a Fibroblast derived Growth Factor stimulates Mast Cells and Erythroid Progenitors. *EMBO J* 1990;9(10):3287-94
- 66 Miettinen M, Lasota J, KIT (CD117): A Review on Expression in Normal and Neoplastic Tissues, and Mutations and their Clinicopathologic Correlation. *Appl Immuno & Mol Morph* 2005;13(3):205-220
- 67 Wandzioch E, Edling CE, Palmer RH, Activation of MAP-Kinase Pathway by c-kit is PI-3 Kinase dependent in Hematopoietic Progenitor / Stem Cell Lines. *Blood* 2004;104(1):51-7.
- 68 Engström M, Karlsson R, Jönsson JI, Inactivation of Forkhead Transcription Factor FoxO3 is essential for PKB-mediated Survival of Hematopoietic Progenitor Cells by KIT Ligand. *Exp Hematol.* 2003;31(4):316-23
- 69 Fazel Shafie, Cimini M, Chen L, Cardioprotective c-kit(+)-Cells are from the Bone Marrow and regulate the Myocardial Balance of Angiogenic Cytokines. *J Clin Invest.* 2006;116:1865-77
- 70 Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into Cardiac Myocytes in Myocardial Infarcts. *Nature* 2004;428(6983):664-8
- 71 Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Bone Marrow-Derived Hematopoietic Cells generate Cardiomyocytes at a low Frequency through Cell Fusion, but not Transdifferentiation.

- 72 Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Human Cardiac Stem Cells. *Proc Natl Sci USA* 2007;104(35):14068-73
- 73 Bamezai A, Mouse Ly-6 Proteins and their Extended Family: Markers of Cell Differentiation and Regulators of Cell Signaling. *Arch Immunol Ther Exp* 2004;52(4):255-66
- 74 De Bruijn MF, Ma X, Robin C, Hematopoietic Stem Cells localize to the Endothelial Cell Layer in the Midgestation Mouse Aorta. *Immunity* 2002;16(5):673-83
- 75 Holmes C, Stanford WL, Concise Review: Stem Cell Antigen-1: Expression, Function and Enigma. *Stem Cells* 2007;25:1339-1347
- 76 Matsuura K, Honda A, Nagai T, Adult Cardiac Sca-1-positive Cells differentiate into beating Cardiomyocytes. *J Clin. Invest.* 2004;279(12):11384-91
- 77 Xin M, Davis CA, Molkenstein JD, A threshold of GATA-4 and GATA-6 Expression is required for Cardiovascular Development. *PNAS* 2006;103(30):11189-11194
- 78 Bisping E, Ikeda S, Kong SW, GATA4 is required for Maintenance of Postnatal Cardiac Function and Protection from Pressure Overload-induced Heart Failure. *PNAS* 2006;103(39):14471-14476
- 79 Schluterman MK, Krysiak AE, Kathiriya IS, Screening and Biological Analysis of GATA-4 Sequence Variations Identified in Patients with Congenital Heart Disease. *Am J Med Gen* 2007;143A:817-823
- 80 Roy M, Pear WS, Aster JC, The multifaceted Role of Notch in Cancer. *Curr Op in Gen & Development* 2007;17:52-59
- 81 Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G, A Homolog of Drosophila Notch expressed during Mammalian Development. *Development* 1991;113(1):199-205
- 82 High FA, Zhang M, Proweller A, An essential Role for Notch in Neural Crest during Cardiovascular Development and Smooth Muscle Differentiation. *J Clin Invest.* 2007;117(2):353-363
- 83 Radtke F, Schweisguth F, Pear W, The Notch “Gospel”. *EMBO Reports* 2005;6(12):1120-1125
- 84 Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Expression Analysis with Oligonucleotide Microarrays reveals that MYC regulates Genes involved in Growth, Cell Cycle, Signaling and Adhesion. *PNAS* 2000;97(7):3260-65
- 85 Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM, Mysterious Liaisons: the Relationship between c-Myc and the Cell Cycle. *Oncogene* 1999;18:2934-3941
- 86 Bellmann K, Martel J, Poirier DJ, Downregulation of PI3K/Akt survival Pathway in Cells with deregulated Expression of c-Myc. *Apoptosis* 2006;11:1311-1319

- 87 Platonova N, Scotti M, Babich P, TBX3, the Gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, promotes Growth of Mammary Epithelial Cells via Repression of p19ARF, independently of p53. *Cell Tissue Res* 2007;328:301-316
- 88 Yamada M, Revelli JP, Eichele G, Expression of Chick Tbx-2, Tbx-3 and Tbx-5 Genes during Early Heart Development: Evidence for BMP2 Induction of Tbx-2. *Developmental Biology* 2000;228:95-105
- 89 Hoogaars W, Tessari A, Moorman A, The transcriptional Repressor Tbx3 delineates the Developing Central Conduction System of the Heart. *Cardiovascular Research* 2004;62:489-499
- 90 Plageman TF, Yutzey K, The T-Box Genes and Heart Development: Putting the “T” in the Heart. *Developmental Dynamics* 2004;232:11-20
- 91 Yin W, Cheepala S, Roberts JN, Active STAT3 is required for Survival of Human Squamous Cell Carcinoma Cells in Serum-free conditions. *Molecular Cancer* 2006;5(15)10.1186/1476-4598
- 92 Heinrich PC, Schaper F, Timmermann A. Endokrine Funktionen II: Zytokine. In: Löffler & Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer 2003:815-827
- 93 O’Shea JJ, Jaks, STATs, Cytokine Signal Transduction, and Immunoregulation: Are we there yet? *Immunity* 1997;7:1-11
- 94 Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Two Signals are necessary for Cell Proliferation induced by a Cytokine Receptor gp130: Involvement of STAT3 in Anti-Apoptosis. *Immunity* 1996;5:449-460
- 95 Gnecci M, He H, Noiseux N, Evidence supporting Paracrine Hypothesis for Akt-Modified Mesenchymal Stem Cell-mediated Cardiac Protection and Functional Improvement. *FASEB* 2006;20:661-669
- 96 Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Myocardial Akt Activation and Gender. *Circulation Research* 2001;88:1020-1027
- 97 Mirosou M, Zhang Z, Deb A, Secreted frizzled related Protein 2 (Sfrp2) is the Key Akt-mesenchymal Stem Cell-released paracrine Factor mediating Myocardial Survival Repair. *PNAS* 2007;104(5):1643-1648
- 98 Kim JK, Pedram A, Razandi M, Estrogen Prevents Cardiomyocyte Apoptosis through Inhibition of Reactive Oxygen Species and Differential Regulation of p38 Kinase Isoforms. *J Biol Chem*. 2005;281(10):6760-6767

- 99 Xu C, Police S, Rao N, Characterization and Enrichment of Cardiomyocytes derived from Human Embryonic Stem Cells.
- 100 Jackson KA, Majka SM, Wang H, Regeneration of Ischemic Cardiac Muscle and Vascular Endothelium by Adult Stem Cells. *J Clin Invest.* 2001;107(11):1395-402
- 101 Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Human Mesenchymal Stem Cells differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the adult Murine Heart. *Circulation* 2002;105(1):93-8
- 102 Murry CE, Field LJ, Menasché P, Cell-Based Cardiac Repair. *Circulation* 2005;112:3174-83
- 103 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Intracoronary autologous Bone-Marrow Cell Transfer after Myocardial Infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141-8
- 104 Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Stem Cell Niches in the adult Mouse Heart. *PNAS* 2006;103(24):9226-31
- 105 Anversa P, Leri A, Kajstura J, Cardiac Regeneration 2006. *J Am Coll Card* 2006;47:1769-76
- 106 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Adult Cardiac Stem Cells are multipotent and support Myocardial Regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76
- 107 Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Cardiac Progenitor Cells from Adult Myocardium: Homing, Differentiation and Fusion after Infarction. *PNAS* 2003;100(21):12313-8
- 108 Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Postnatal isl1+ Cardioblasts enter fully differentiated Cardiomyocyte Lineages. *Nature* 2005;433(7063):647-53
- 109 Anversa P, Kajstura J, Leri A, Life and Death of Cardiac Stem Cells. *Circulation* 2006;113:1451-1463
- 110 Linke A, Müller P, Nurzynska D, Stem Cells in the Dog Heart are Self-Renewing, Clonogenic and Multipotent and Regenerate infarcted Myocardium, Improving Cardiac Function. *PNAS* 2005;102(18):8966-8971
- 111 Hamada H, Kon Kim M, Iwakura A, ER alpha and beta mediate Contribution of Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells to functional Recovery after Myocardial Infarction. *Circulation* 2006;114:2261-70
- 112 Regitz-Zagrosek V, Espinola-Klein C, Schlagen Frauenherzen anders?. *Kardiologie up2date* 2006;10:255-269
- 113 Nian M, Lee P, Khaper N, Inflammatory Cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ. Res.* 2004;94(12):1543-53

- 114 Deasy BM, Lu A, Tebbets JC A role for cell sex in Stem-Cell-mediated skeletal muscle regeneration. *J Cell Biol* 2007;177:73-86
- 115 Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, ER α upregulation and redistribution in Human Heart Failure. *FASEB J* 2006;20:926-34
- 116 Satoh M, Matter CM, Ogita H, Inhibition of Apoptosis-regulated Kinase-1 and Prevention of congestive Heart Failure by Estrogen. *Circulation* 2007;115:3197-204
- 117 Yang SH, Liu R, Perez EJ, Mitochondrial Localization of ER β . *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:4130-5
- 118 Sugishita K, Li F, Su Z, Anti-oxident effects of Estrogen Receptor Reduce Ca²⁺ during metabolic Inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:331-6.
- 119 Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Paracrine Mechanisms in adult Stem Cell Signaling and Therapy. *Circ Res.* 2008;103(11):1204-19

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Thomas Unger, für die Führung durch die gesamte Arbeit. Sein kritischer Geist und seine fortwährende Unterstützung waren für mich vor allem in den schwierigen Phasen des Projektes von größter Hilfe.

Meinem Betreuer, Dr. med. Jun Li möchte ich meine Dankbarkeit für sein unermüdliches Engagement, seine Kreativität und Präsenz in jeder Phase der Arbeit aussprechen. Seine Ideen, aber auch seine große Überzeugung haben mir immer neue Energie gegeben.

Mein großer Dank gilt auch Melanie Timm, die mich mit Geduld und Umsicht in die Laborarbeit eingeführt hat, und während der experimentellen Phase nie um Rat oder Tat verlegen war. Ihre wertvolle Hilfe hat wesentlich zu der Arbeit beigetragen.

Ferner möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe im Center for Cardiovascular Research bedanken, insbesondere bei meinen Weggefährten Caterina Curato und Wassim Altarche-Xifró, deren Ratschläge und Unterstützung von großem Wert waren.

Für die unschätzbare Hilfe im tierexperimentellen Teil der Arbeit danke ich Dr. med. Elena Kaschina sowie Dr. med. Alexandra Grzesiak.

Zudem möchte ich mich für die wunderbare Hilfe in schwierigen Momenten bei meinen Eltern, Elisabeth Hofmann, Jesco Delorme, John Kolya Reichart, Ingolf Karst, Philipp Lehmann und Monique Woischwill bedanken.

8 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Marie Perle Brinckmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Stimulation des Östrogen-Rezeptors α in c-kit (+)-Zellen unterstützt das Überleben von Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes wird der Lebenslauf in der elektronischen Version nicht aufgeführt.

10 Publikation

Brinckmann M, Kaschina E, Altarche-Xifró W, Estrogen Receptor α supports cardiomyocytes indirectly through post-infarct cardiac c-kit⁺ cells. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47(1):66-75.