

Aus dem Institut für Geschlechterforschung in der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Dissertation**

**Einfluss von Östrogen auf den mitochondrialen Metabolismus bei  
drucklast-induzierter Myokardhypertrophie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Malick Dansokho

aus Halle (Saale)

Datum der Promotion: 09.12.2016

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Zusammenfassung .....	V
Abstract .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	IX
Tabellenverzeichnis .....	XI
Abkürzungsverzeichnis .....	XII
1 Einleitung .....	1
1.1 Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz .....	1
1.2 Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie .....	1
1.3 Östrogen und Östrogenrezeptoren .....	2
1.3.1 Wirkungswege des Steroidhormons Östrogen .....	2
1.3.2 Einfluss von Östrogen auf die Myokardhypertrophie .....	3
1.4 Der Energiestoffwechsel bei Myokardhypertrophie und die Rolle Östrogens ..	4
1.4.1 Mitochondriale Atmungskette bei MH und die Rolle Östrogens .....	5
1.4.2 Regulation der ETK-Synthese und die Rolle Östrogens .....	6
1.4.3 Der Fettsäurestoffwechsel.....	7
1.4.4 Regulation des Fettsäurestoffwechsels und die Rolle Östrogens .....	8
1.4.5 Metabolische Veränderungen bei Hypertrophie.....	9
1.5 Antioxidative Enzyme bei MH und die Rolle des Östrogens.....	10
1.6 Ziele und Fragestellung .....	12
2 Material .....	13
2.1 Gewebe .....	13
2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien .....	13
2.3 Puffer und Lösungen .....	14
2.4 Geräte .....	15
2.5 Software .....	16
2.6 Sonstiges.....	16
2.7 Oligonukleotide (Primer) .....	17
2.8 Antikörper .....	18
3 Methoden .....	20
3.1 Studiendesign.....	20
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	22

---

3.2.1	RNA-Isolierung aus Myokardgewebe .....	22
3.2.2	DNA-Isolierung aus Myokardgewebe .....	22
3.2.3	RNA- und DNA-Konzentrationsmessung.....	23
3.2.4	Reverse Transkription .....	23
3.2.5	Realtime PCR .....	24
3.3	Biochemische Methoden .....	25
3.3.1	Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung.....	25
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	26
3.3.3	Western Blot .....	26
3.3.4	Antikörperhybridisierung.....	27
3.3.5	Detektion.....	27
3.3.6	Stripping-Protokoll.....	27
3.4	Normalisierung .....	27
3.5	Statistik.....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Parameter der kardialen Funktion und Hypertrophie.....	29
4.1.1	MH-Entwicklung nach Drucklastinduktion (4 Wochen) .....	29
4.1.2	E2 verhindert die TAC-induzierte EF-Reduktion in Männchen und OVX ...	31
4.2	Veränderungen im Glukosemetabolismus bei Hypertrophie und E2-Effekte ..	33
4.2.1	E2 hemmt die MH-induzierte Glut-Reduktion in Männchen .....	33
4.2.2	E2 steigert die Expression der HK2 und der PFKm in OVX.....	34
4.3	Fettsäurestoffwechsel bei MH und Einflüsse Östrogens .....	35
4.3.1	E2 erhält die PPAR $\alpha$ -Expression bei MH in Männchen und OVX .....	35
4.3.2	E2 erhält die PPAR $\beta/\delta$ -Expression bei MH in Weibchen .....	36
4.3.3	E2 erhält die PPAR $\gamma$ -Expression bei MH in Weibchen .....	38
4.3.4	GU und E2-Einflüsse im Fettsäuretransport bei MH.....	38
4.3.5	E2 erhält die MCAD- und LCAD-Expression bei MH .....	40
4.3.6	E2 erhält die ACOX-Expression bei MH in Weibchen.....	41
4.4	GU in der Expression metabolischer Regulatoren bei MH .....	42
4.4.1	E2 erhält die PGC-1 $\alpha$ -Expression in Männchen und OVX.....	42
4.4.2	E2-Behandlung steigert die NRF-1-Expression in Weibchen.....	43
4.5	GU in der Expression nukleär kodierter ETK-Komponenten bei MH .....	44
4.5.1	Gen- und Proteinexpression von ETK-Komponenten und E2-Einflüsse ....	44

---

4.6	GU in der Expression mitochondrial kodierter ETK-Untereinheiten bei MH....	47
4.6.1	TAC-induzierte COX3- und ND1-Steigerung in Männchen .....	48
4.7	GU in der Expression antioxidativer Enzyme bei MH .....	49
4.7.1	E2 erhält die UCP3-Expression bei MH in Männchen und OVX .....	49
4.7.2	E2 erhält die SOD2-Expression bei MH in Weibchen .....	50
4.7.3	GU in der ALDH2-Expression.....	50
4.7.4	TAC induziert oxidativen Stress in männlichen Mäusen .....	51
4.8	Expressionsmuster von ER $\alpha$ und $\beta$ bei Hypertrophie und E2-Behandlung....	52
4.8.1	E2 erhöht die ER $\beta$ -Expression in Sham-Tieren .....	52
5	Diskussion.....	54
5.1	Morphologie und Herzfunktion im Verlauf .....	55
5.1.1	E2-Wirkungen auf die systolische Herzfunktion.....	55
5.2	E2-Wirkungen und GU im Glukosestoffwechsel bei MH .....	56
5.2.1	E2-vermittelte Steigerung der Glut-Expression.....	56
5.2.2	E2 steigert die Schlüsselenzyme der Glykolyse HK2 und PFKm nach OVX. .....	58
5.3	GU und E2-Effekte in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels .....	58
5.3.1	PPAR $\alpha$ und PGC-1 $\alpha$ dominieren die FAO-Regulation bei MH in Männchen. .....	58
5.3.2	PPAR $\beta/\delta$ dominiert die FAO-Regulation bei MH in Weibchen .....	61
5.3.3	E2 hemmt TAC-induzierte PPAR $\gamma$ -Reduktion in Weibchen .....	64
5.4	GU und E2-Effekte in der ETK-Biogenese .....	65
5.4.1	TAC induziert kompensatorische mtDNA-Steigerung in Männchen.....	65
5.4.2	Kompensierte MH mit erhaltener Proteinexpression der ETK-Komplexe...69	
5.5	E2 steigert antioxidative Systeme in Weibchen.....	70
5.6	E2 steigert ER $\beta$ -Expression in beiden Geschlechtern.....	72
5.7	Bedeutung der metabolischen Veränderungen bei MH.....	73
5.8	Fazit .....	74
5.8.1	Hypothetisches Modell .....	76
5.9	Limitationen .....	76
5.10	Ausblick und pharmakologische Ansatzpunkte .....	77
	Literaturverzeichnis.....	79
	Eidesstattliche Versicherung.....	88

---

Lebenslauf .....	89
Kongressbeiträge.....	90
Danksagung .....	91

---

## Zusammenfassung

Geschlechterunterschiede (GU) bei Myokardhypertrophie (MH) wurden bereits auf Sexu-  
alhormone wie Östrogen (E2) zurückgeführt. Ziel dieser Arbeit ist die weitere Charakteri-  
sierung von GU und der Rolle Östrogens in der Regulation von Gen- und Proteinexpres-  
sion im Energiemetabolismus bei MH.

Dazu wurden Schlüsselregulatoren des Fettsäuremetabolismus wie der Peroxisomen  
Proliferierende Aktivierte Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), PPAR $\gamma$  Ko-Aktivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) und  
PPAR $\beta/\delta$ , sowie Glukosemetabolismus, Atmungskettenkomplexe und antioxidative En-  
zyme in einem Mausmodell drucklast-induzierter linksventrikulärer Hypertrophie analy-  
siert. Vor Beginn dieser Studie war eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) oder eine  
Schein-OP (Sham) in weiblichen, männlichen und ovariectomierten Mäusen (OVX) durch-  
geführt worden. Die Tiere waren entweder mit phytoöstrogenfreiem (Placebo) oder E2-  
angereichertem Futter ernährt worden. Die Organe waren nach vier Wochen entnommen  
und bis zur Verwendung bei minus 80°C gelagert worden. Die Analyse der relativen Gen-  
und Proteinexpression erfolgte mittels RT-PCR und Western Blot.

Die TAC induzierte eine MH, die E2-Behandlung reduzierte die MH in allen drei TAC-  
Gruppen. In Weibchen blieb die Ejektionsfraktion (EF) unverändert. In den männlichen  
und OVX-Tieren führte die TAC zur signifikanten EF-Reduktion ( $p < 0.05$ ). Die E2-  
Behandlung verhinderte diese EF-Verminderung.

In Weibchen waren PPAR $\alpha$  und PGC-1 $\alpha$  nach TAC-Induktion unverändert exprimiert. In  
den männlichen und OVX-Tieren war die Expression von PPAR $\alpha$  und PGC-1 $\alpha$ , sowie  
mehrerer Zielgene signifikant vermindert. Die E2-Behandlung führte zum Erhalt einer sig-  
nifikant höheren Expression dieser Regulatoren in männlichen und OVX-TAC-Tieren im  
Vergleich zur Placebobehandlung ( $p < 0.05$ ).

Die PPAR $\beta/\delta$ -Expression war nach TAC-Induktion ausschließlich in den Weibchen ver-  
mindert. Unter E2-Behandlung war keine Reduktion der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression zu ver-  
zeichnen. Weiterhin war eine Reduktion mehrerer PPAR $\beta/\delta$ -Zielgene in den weiblichen  
TAC-Tieren zu beobachten.

Die TAC führte zur Reduktion der Glukosetransporter 1 und 4 in Männchen und Weib-  
chen.

Eine TAC-assoziierte Steigerung der Atmungskettenkomplex-Untereinheiten ND1 und  
COX3 wurde ausschließlich in männlichen Tieren beobachtet und war unter E2-  
Behandlung nicht zu verzeichnen.

---

Signifikante TAC-induzierte oxidative Proteinschädigungen zeigten sich ausschließlich in den placebobehandelten Männchen.

Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben einen Energiestoffwechsel bei kompensierter MH und bestätigen die bereits beschriebene MH-induzierte Herabregulation des Fettsäuremetabolismus. Diese scheint jedoch unterschiedlich vermittelt zu werden. Die EF-Reduktion in Männchen und OVX ist assoziiert mit einer wahrscheinlich PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -vermittelten Reduktion des Fettsäurestoffwechsels. E2 beugt diesem Prozess vor. In Weibchen führte TAC bei stabiler EF zur PPAR $\beta/\delta$ -Verminderung. Dies spricht für ein günstigeres MH-Stadium. E2 hemmt die PPAR $\beta/\delta$ -Senkung in weiblichen Tieren.

Diese Befunde sprechen für das Vorliegen E2-vermittelter GU in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels bei drucklast-induzierter MH.

---

## Abstract

The decline of mitochondrial metabolism is a common feature of the hypertrophied heart. Oestrogen (E2) has previously been suggested to mediate sex differences preserving mitochondrial metabolism in myocardial hypertrophy. This study aims to describe the role of E2 in gene expression of mitochondrial metabolism in the hypertrophied heart.

Key regulators of fatty acid metabolism (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), PPAR $\gamma$  coactivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) and PPAR $\beta/\delta$ ) and glucose metabolism, mitochondrial respiratory chain complexes and antioxidative enzymes were analysed in a murine model of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy (LVH). Prior to the analysis, female, male and ovariectomised (OVX) female mice aged nine weeks had been subjected to transverse aortic constriction (TAC) or sham surgery (sham) and fed with phytoestrogen-free (placebo) or E2-enriched food. Organs had been harvested after week four. Relative gene and protein expression were measured by RT-PCR and western blot, respectively, in left ventricle whole cell lysates.

TAC induced LVH, and E2 reduced LVH in all groups. In female mice, ejection fraction (EF) remained stable. In placebo male and OVX mice, TAC significantly decreased EF. E2 treatment prevented the EF decline.

The expression of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  remained stable in females but was significantly reduced in male and OVX mice. Several PPAR $\alpha$  target genes were downregulated accordingly in males and OVX. E2 treatment preserved a significantly higher expression of these genes in males and OVX.

TAC induced a reduction in glucose transporters 1 and 4 in both males and females.

In males only, TAC was associated with an increase in ND1 and COX3, subunits of respiratory chain complex IV. Under E2 treatment, no changes were observed.

Furthermore, TAC induced significant oxidative protein damage in males only.

Our results are consistent with an energy metabolism of compensated LVH and suggest that TAC-induced changes in fatty acid metabolism occur in both females and males, but are mediated differently. In male and OVX animals, the decline of EF is associated with a decrease in PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$ . In females, no reduction in EF occurred, indicating a more favourable stage of LVH. LVH in female mice is associated with a decrease of PPAR $\beta/\delta$ .

In males and OVX, E2 prevents EF decline and preserves PPAR $\alpha$ /PGC1- $\alpha$  expression. In females, E2 prevents TAC-induced PPAR $\beta/\delta$  decrease. These findings emphasise sex



---

differences and a major role of E2 in the regulation of mitochondrial metabolism in TAC-induced LVH in both males and females.

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Genomische und nicht-genomische Östrogenwirkungen .....	3
Abbildung 1.2: Darstellung der Hauptsubstratwege des mitochondrialen Metabolismus und der ATP-Synthese.....	5
Abbildung 1.3: Darstellung der Komponenten der Elektronentransportkette .....	6
Abbildung 1.4: Das mitochondriale Genom .....	7
Abbildung 1.5: Schematische Übersicht des mitochondrialen und peroxisomalen Fettsäuremetabolismus.....	8
Abbildung 1.6: Signaltransduktionswege von PGC-1 $\alpha$ .....	10
Abbildung 1.7: Überblick über die mitochondriale ROS-Produktion.....	11
Abbildung 3.8: Studienablauf: Überblick des Gesamtprojektes .....	21
Abbildung 4.9: Darstellung des relativen Herzgewichts vier Wochen nach TAC-Induktion	30
Abbildung 4.10: Darstellung der relativen LVM nach vier Wochen TAC. ....	30
Abbildung 4.11: Darstellung der Ejektionsfraktion nach vier Wochen TAC.....	31
Abbildung 4.12: Darstellung der Verkürzungsfraktion nach vier Wochen TAC. ....	31
Abbildung 4.13: Darstellung der relativen Glut4-Genexpression. ....	33
Abbildung 4.14: Darstellung der relativen Glut1-Genexpression. ....	34
Abbildung 4.15: Darstellung der relativen HK2-Genexpression.....	35
Abbildung 4.16: Darstellung der relativen PFKm-Genexpression.....	35
Abbildung 4.17: Darstellung der relativen PPAR $\alpha$ -Genexpression.....	36
Abbildung 4.18: Darstellung der relativen PPAR $\alpha$ -Proteinexpression.....	36
Abbildung 4.19: Darstellung der relativen PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression. ....	37
Abbildung 4.20: Darstellung der relativen PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression.....	37
Abbildung 4.21: Darstellung der relativen PPAR $\gamma$ -Genexpression. ....	38
Abbildung 4.22: Darstellung der relativen CD36-Genexpression.....	39
Abbildung 4.23: Darstellung der relativen CPT-1-Genexpression.....	40
Abbildung 4.24: Darstellung der relativen CPT-2-Genexpression.....	40
Abbildung 4.25: Darstellung der relativen MCAD-Genexpression .....	41
Abbildung 4.26: Darstellung der relativen LCAD-Genexpression. ....	41

---

Abbildung 4.27: Darstellung der relativen ACOX-1-Genexpression.....	42
Abbildung 4.28: Darstellung der relativen PGC-1 $\alpha$ -Genexpression.....	43
Abbildung 4.29: Darstellung der relativen PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression .....	43
Abbildung 4.30: Darstellung der relativen NRF-1-Genexpression .....	43
Abbildung 4.31: Darstellung der relativen Tfam-Genexpression. ....	44
Abbildung 4.32: Darstellung der relativen COX5 $\alpha$ -Genexpression .....	45
Abbildung 4.33: Darstellung der relativen COX7A2-Genexpression.....	45
Abbildung 4.34: Darstellung der relativen NDUFB8-Proteinexpression .....	46
Abbildung 4.35: Darstellung der relativen SDHB-Proteinexpression. ....	46
Abbildung 4.36: Darstellung der relativen UQCRC2-Proteinexpression .....	46
Abbildung 4.37: Darstellung der relativen ATP5k-Genexpression .....	47
Abbildung 4.38: Darstellung der relativen ATP5A-Proteinexpression .....	47
Abbildung 4.39: Darstellung der relativen COX3-Genexpression .....	48
Abbildung 4.40: Darstellung der relativen ND1-Genexpression.....	48
Abbildung 4.41: Darstellung der relativen COX1-Proteinexpression.....	49
Abbildung 4.42: Darstellung der relativen UCP3-Genexpression .....	50
Abbildung 4.43: Darstellung der relativen SOD2-Proteinexpression.....	50
Abbildung 4.44: Darstellung der relativen ALDH2-Proteinexpression.....	51
Abbildung 4.45: Darstellung der relativen 4-HNE-Modifizierung von Proteinen mit einer Molekularmasse von etwa 36 kDa .....	52
Abbildung 4.46: Darstellung der relativen 4-HNE-Modifizierung von Proteinen mit einer Molekularmasse von etwa 90 kDa .....	52
Abbildung 4.47: Darstellung der relativen ER $\beta$ -Proteinexpression .....	53
Abbildung 4.48: Darstellung der relativen ER $\alpha$ -Proteinexpression .....	53
Abbildung 5.49: Hypothetisches Modell zu E2-Wirkungen und Geschlechterunterschieden in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels in Assoziation zur Herzfunktion .....	76

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Tiergruppen.....	18
Tabelle 3.2: Komponenten des Mastermix für die Reverse Transkription.....	21
Tabelle 3.3: Arbeitsbedingungen des Master Cycler .....	21
Tabelle 3.4: Komponenten des RT-PCR Mastermix + cDNA-Probe.....	22
Tabelle 3.5 Mastermix RT PCR + DNA.....	22
Tabelle 3.6: Komponenten des Proteinlysispuffers .....	23
Tabelle 3.7: Komponenten der SDS-Polyacrylamid-Gele.....	24

---

## Abkürzungsverzeichnis

ACOX	Acyl-CoA-Oxidase
AK	Antikörper
ALDH2	Alkoholdehydrogenase 2
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aortenklappenstenose
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5k	ATP-Synthase, mitochondrialer F1/F0-Komplex
BCA	Bicinchinonsäure
Bp	Basenpaar
BR	Block Reagenz
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad in Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
CD36	Cluster of Differentiation 36/Fatty acid translocase (engl.)
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit, Komplex IV
CPT1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E2	Östradiol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion in Prozent
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Östrogenrezeptor $\beta$
ER $\alpha$ KO	Östrogenrezeptor- $\alpha$ -Knockout
ER $\beta$ KO	Östrogenrezeptor- $\beta$ -Knockout
ERE	Östrogen-responsives Element
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
ETK	Elektronentransportkette
FA	Fettsäure

---

FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FAO	Fettsäureoxidation
FS	Fractional shortening (engl.), Verkürzungsfraction
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT1/4	Glukosetransporter, Isoform 1 und 4
GPOR	G-Protein-gekoppelter Östrogenrezeptor
GU	Geschlechterunterschiede
HF	Heart Failure (engl.), Herzinsuffizienz
HFpEF	Heart Failure with preserved Ejection Fraction
HFREF	Heart Failure with reduced Ejection Fraction
HK	Hexokinase
4-HNE	4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HW	Herzgewicht
HW/KW	Herzgewicht/Körpergewicht
HW/TL	Herzgewicht/Tibia-Länge
IGEPAL	Polyoxyethylen-5-Nonylphenylether, verzweigt
kDa	Kilo Dalton
LCAD	Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
LV	linker Ventrikel
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVM	linksventrikuläre Masse
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MCAD	Medium Chain Acyl Dehydrogenase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7, humane Brustkrebszelllinie
MH	Myokardhypertrophie
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mRNA	messenger (Boten-) RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrogenase
nDNA	nukleäre DNA
ng	Nanogramm

---

---

NRF	nukleärer respiratorischer Faktor
OVX	Ovarektomie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PFK <sub>m</sub>	Phosphofruktokinase, muskulär
Plac	Placebo
PPAR	Peroxisomen Proliferierender Aktivierter Rezeptor
PPAR $\alpha$ KO	PPAR $\alpha$ -Knockout
PPRE	PPAR-responsives Element
PGC-1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ -Ko-Aktivator
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SOD	Superoxiddismutase
Ripa-Puffer	Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sham	Scheinoperiert
Tfam	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TFB1/2M	mitochondrialer Transkriptionsfaktor B1/B2
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UCP	Uncoupling-Protein
VLCAD	Very long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
WT	Wildtyp

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Linksventrikuläre Myokardhypertrophie (LVH) ist ein Kompensationsmechanismus des Herzens, der bei langfristig erhöhter Arbeitslast zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Herzminutenvolumens beiträgt. Dennoch gilt sie als Risikofaktor für die Entstehung von Herzinsuffizienz (*heart failure*, HF)<sup>1</sup>. HF ist ein komplexes klinisches Syndrom, welches sich sowohl in Form von Dyspnoe, Ermüdungserscheinungen, pulmonalen und peripheren Ödemen, als auch Nykturie manifestieren kann<sup>2</sup>. Es resultiert aus strukturellen oder funktionellen Störungen der ventrikulären Füllung oder des Blutauswurfs. Dabei ist derjenige prozentuale Anteil des enddiastolischen linksventrikulären Volumens, welcher in den Kreislauf ausgeworfen wird, als Ejektionsfraktion (EF) definiert. HF kann mit Bezug auf die EF in 2 Formen unterteilt werden: die HF mit reduzierter EF (HF<sub>r</sub>EF) liegt vor bei einer EF  $\leq 40\%$ . Bei der zweiten Form handelt es sich um die HF mit erhaltener EF (HF<sub>p</sub>EF)<sup>2</sup>, teilweise auch als HF mit normaler EF bezeichnet (HFNEF)<sup>3</sup>. Eine Chronisch erhöhte Drucklast, wie zum Beispiel durch eine Aortenklappenstenose (AS) oder Hypertonie induziert, führt durch die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie zur Erhöhung der linksventrikulären Masse (LVM). Die dauerhaft erhöhte Druckbelastung des linken Ventrikels zählt zu den häufigsten Ursachen der HF<sup>4</sup>. Weitere Risikofaktoren der HF sind Diabetes mellitus, Metabolisches Syndrom und Artherosklerose. Darüber hinaus können strukturelle Anomalien des Herzens in Form von Kardiomyopathien unterschiedlicher Genese zu HF führen<sup>2</sup>.

Mit einer Prävalenz von 1-2% zählt HF zu den häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen westlicher Länder<sup>5</sup>. Trotz bedeutender therapeutischer Fortschritte ist Herzinsuffizienz mit einer deutlich verringerten Lebenserwartung und Lebensqualität assoziiert<sup>6</sup>.

## 1.2 Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die weltweit häufigste Todesursache bei Männern und Frauen<sup>7</sup>. Männer entwickeln Herzkreislauferkrankungen einschließlich HF im Durchschnitt in einem jüngeren Alter als Frauen<sup>8</sup>. Laut der Framingham Herzstudie ist die Prognose nach dem Einsetzen der Herzinsuffizienz bei Frauen deutlich günstiger als bei Männern<sup>9</sup>. Darüber hinaus unterscheiden sich HF-Patienten und -Patientinnen in ihrem Risikofaktorprofil. So stellt arterielle Hypertonie bei Frauen ein größeres attributives Risiko für die Entwicklung von HF als bei Männern dar<sup>10</sup>. Weiterhin stellen bei Frauen Adipositas, Diabetes und eine gestörte Glukosetoleranz im Vergleich zu Männern ein erhöhtes Risiko für HF dar und führen zu stärkeren Stoffwechselstörungen<sup>11</sup>. Dagegen sind bei



---

männlichen Patienten koronare Herzkrankheiten und dilatative Kardiomyopathien als Hauptrisikofaktoren beschrieben<sup>10</sup>. Frauen entwickeln bei langfristig erhöhter Drucklast überwiegend eine HF mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF), die eine günstigere Form der LVH darstellt<sup>12</sup>. Bei Männern überwiegt die HF mit reduzierter EF (HFrEF)<sup>12</sup>. Diese stellt jedoch bei Manifestation der Myokardhypertrophie einen größeren Risikofaktor für weibliche Betroffene dar<sup>13</sup>. Dennoch ist auch die HFpEF bei Frauen eine schwere Erkrankung, für die es noch keine Standardtherapie gibt.

Bei Patienten und Patientinnen mit diagnostizierter Aortenklappenstenose (AS), spielt die erhöhte Nachlast eine zentrale Rolle für die Myokardhypertrophie- und HF-Genese. Untersuchungen zur Hypertrophie-Entwicklung bei Patienten mit AS im Alter von mindestens 60 Jahren wiesen auf deutliche Unterschiede im Geschlechtervergleich hin. Demnach wiesen weibliche Herzen mit AS eine eher adaptive, konzentrische Form der MH auf, wohingegen männliche Herzen stärker zur maladaptiven, exzentrischen MH mit Dilatation des linken Ventrikels tendierten<sup>14,15</sup>.

Die oben angeführten Beispiele für kardiovaskuläre Geschlechterunterschiede (GU) weisen auf die Tragweite geschlechtsspezifischer Pathomechanismen hin. Die zugrundeliegenden biologischen und molekularen Prozesse werden noch nicht ausreichend verstanden, um geeignete neue Therapiekonzepte zu etablieren. Diese Prozesse könnten durch Östrogen und Östrogenrezeptoren vermittelt werden<sup>16</sup>. Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung von Stoffwechselwegen, die durch Östrogen und die entsprechenden Rezeptoren beeinflusst werden.

### **1.3 Östrogen und Östrogenrezeptoren**

#### **1.3.1 Wirkungswege des Steroidhormons Östrogen**

Die biologischen Funktionen des Hormons 17- $\beta$ -Östradiol werden unter anderem durch die klassischen Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  übermittelt. Diese gehören zur Familie nukleärer Steroidhormonrezeptoren, welche als liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren agieren<sup>17</sup>. Beide Rezeptoren bestehen aus den Domänen A bis F, wobei die Domänen A/B die größten strukturellen Unterschiede aufweisen<sup>18</sup>. Nach passivem Durchtritt durch die Plasmamembran lagert sich E2 an einen ER an. Dadurch wird die Bildung von Homo- oder Heterodimeren der ER's und deren Bewegung in den Nukleus induziert<sup>19</sup>. Dort erfolgt die Bindung Östrogen-responsiver Elemente (ERE) der Zielgene und somit die Initiierung der Transkription<sup>20</sup>. Andererseits kann der Hormon-Rezeptor-Komplex auch durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren indirekt die Transkription von Genen stimulieren (Abbildung 1.1).

Neben diesem klassischen genomischen Wirkmechanismus über nukleäre Rezeptoren wurden für Östrogen auch schnelle, nicht genomische Effekte, welche über membranständige klassische Östrogenrezeptoren<sup>21</sup> oder über nicht-klassische G-Proteingekoppelte Östrogenrezeptoren (GPER) vermittelt werden<sup>22</sup>, beschrieben. Weiterhin konnte eine Lokalisation von Östrogenrezeptoren in den Mitochondrien nachgewiesen werden<sup>23</sup>.

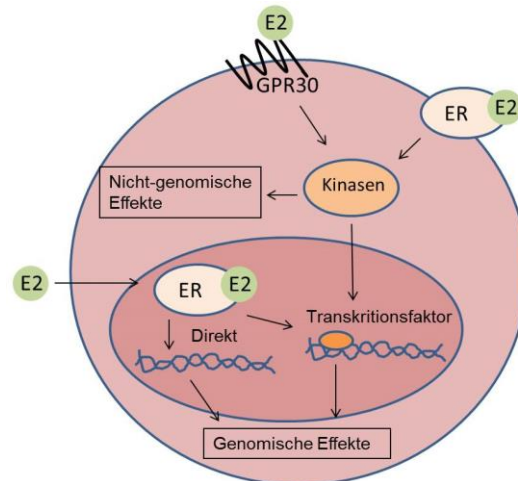


Abbildung 1.1: Genomische und nicht-genomische Östrogenwirkungen, adaptiert von Meldrum (2007)<sup>24</sup>.

### 1.3.2 Einfluss von Östrogen auf die Myokardhypertrophie

Eine Vielzahl von Studien weist darauf hin, dass die Geschlechtshormone Östrogen und Testosteron und ihre Rezeptoren maßgeblich zur unterschiedlichen Ausprägung von Herz-Kreislauf-erkrankungen bei Frauen und Männern beitragen<sup>8</sup>. Weiterhin zeigen Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen, dass GU in der MH-Ausprägung durch E2 vermittelt werden. In einer Studie an ovariectomierten (OVX-) Mäusen mit hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie wurde durch die E2-Behandlung die diastolische Herzfunktion deutlich verbessert<sup>25</sup>. In einer weiteren Studie wurde die Ejektionsfraktion (EF) in OVX-Ratten mit hypertonie-induzierter MH durch die Behandlung mit einem ER $\alpha$ -Agonisten signifikant gesteigert<sup>26</sup>. In OVX-Mäusen mit zweiwöchiger drucklast-induzierter MH-Entwicklung führte eine E2-Behandlung zur signifikanten Reduktion von Fibrose und Hypertrophie und zu signifikant höheren EF-Werten im Vergleich zur Placebobehandlung<sup>27</sup>. Auch eine Angiotensin-induzierte MH-Entwicklung in OVX-Mäusen wurde durch eine E2-Behandlung gehemmt<sup>28</sup>. Weiterhin wiesen transgene weibliche Mäuse mit einer Deletion im ER $\alpha$ -Gen (ER $\alpha$ KO) eine E2-vermittelte Verminderung der MH-Entwicklung auf. Dagegen führte die E2-Behandlung in weiblichen ER $\beta$ KO-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zur Hemmung der MH-Entwicklung<sup>28</sup>. Eine weitere Studie zeigte, dass eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) in weiblichen Mäusen mit ER $\alpha$ KO zu einer ähnlich starken MH-Ausprägung führte wie in weiblichen WT<sup>4</sup>. Dagegen führte die Deletion von ER $\beta$  (ER $\beta$ KO) zu verstärkter MH weiblicher Herzen. Die MH bei

---

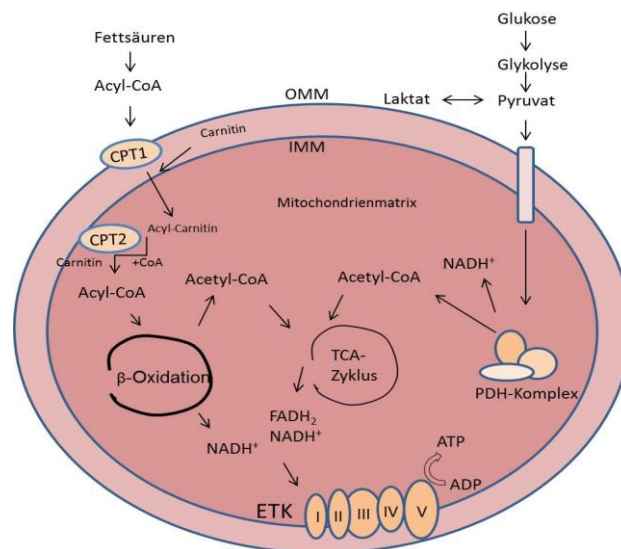
WT-TAC-Männchen wies keine signifikanten Unterschiede zu jener bei TAC-Männchen mit ER $\alpha$ - oder ER $\beta$ -Deletion auf<sup>4</sup>. ER $\beta$  scheint unterschiedliche Effekte bei weiblichen und männlichen TAC-Mäusen zu vermitteln. Bei Weibchen wurde eine ER $\beta$ -vermittelte Hemmung der MH-Entwicklung beobachtet. Dagegen begünstigte ER $\beta$  bei Männchen eine verstärkte MH-Entwicklung mit vermehrter Fibrosierung<sup>16</sup>. In beiden Geschlechtern fanden sich nach ER $\beta$ -Deletion jedoch eine erhöhte Myozytenhypertrophie und Apoptose-Rate. Dies zeigt, dass vor allem in weiblichen Individuen die Progression der Myokardhypertrophie wahrscheinlich durch ER $\beta$  günstig beeinflusst wird.

Diese Studien weisen darauf hin, dass die Östrogenrezeptoren und E2 eine zentrale Rolle in der Vermittlung von GU in der MH-Entwicklung spielen. Neben den ER $\beta$ - und ER $\alpha$ -vermittelten Einflüssen Östrogens auf die MH finden sich zahlreiche Hinweise für E2-Wirkungen auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel. Insbesondere die Bedeutung von GU im Energiemetabolismus wurde in der Pathogenese von MH und HF hervorgehoben<sup>16,29</sup> und ist aktueller Forschungsgegenstand.

#### **1.4 Der Energiestoffwechsel bei Myokardhypertrophie und die Rolle Östrogens**

Das Herz hat einen sehr großen Energiebedarf, jedoch nur geringe Energiespeicherkapazitäten<sup>30</sup>. Daraus folgt ein enormes Energieproduktionsvermögen. Im Normalzustand stellen Fettsäuren (FA) neben Glukose die Hauptsubstrate (Abbildung 1.2) der Energiegewinnung in Myozyten gesunder Herzen erwachsener Säugetiere dar<sup>31</sup>. 60-90% des myokardialen ATP entstammt der Fettsäureoxidation (FAO), während 10-40% auf die Oxidation von Glukose und Laktat in der Glykolyse zurückzuführen sind<sup>32</sup>.

Der Großteil der Glykolyse findet im Zytosol statt. Glukosemoleküle werden dabei über Proteine wie die Glukosetransporter Typ 1 (Glut1) und 4 (Glut4) in die Zelle importiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Phosphorylierung des Glukosemoleküls durch die Hexokinase (HK). Die HK gehört neben der Phosphofruktokinase (PFK) und der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu den Schlüsselenzymen, welche die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Glykolyse katalysieren<sup>33</sup>. Dabei erfolgt ihr letzter Schritt, die Bildung von Acetat durch die PDH, sowie die gesamte FAO im Mitochondrium<sup>32,33</sup>.



**Abbildung 1.2 Darstellung der Hauptsubstratwege des mitochondrialen Metabolismus und der ATP-Synthese, adaptiert von Finck und Kelly (2007)<sup>34</sup>.** OMM = äußere Mitochondrienmembran; IMM = innere Mitochondrienmembran; CPT = Carnitin-Palmitoyl-Transferase; TCA = Tricarbonsäure, Zitronensäure; ETK = Elektronentransportkette.

Das in beiden Stoffwechselwegen entstehende Acetyl-CoA wird dem mitochondrialen Zitratzyklus zugeführt. Im Zitratzyklus und in der FAO entstehen durch Bindung energiereicher Elektronen die reduzierten Formen der Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FADH<sub>2</sub>). Die Elektronen werden schließlich auf die Elektronentransportkette (ETK) übertragen, an der eine Folge von Reduktions- und Oxidationsreaktionen stattfindet. Die hierdurch mobilisierte Energie dient dem Pumpen von Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum. Die Energie des dadurch aufrechterhaltenen Gradienten dient der F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATP-Synthase zur ATP-Produktion. Das generierte ATP dient als Energiesubstrat für die energieabhängigen zellulären Prozesse wie Ionen-transport, Kalziumhomöostase und Myozytenkontraktion<sup>35</sup>.

#### 1.4.1 Mitochondriale Atmungskette bei MH und die Rolle Östrogens

Die mitochondriale Elektronentransportkette (ETK) ist direkt an der ATP-Produktion beteiligt (Abbildung 1.3). Sie besteht aus einer Reihe von Metalloproteinen, welche an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und die Komplexe I bis IV bilden. Die Biogenese der ETK-Komplexe geht zu einem großen Anteil von der nukleären DNA (nDNA) aus. Es werden jedoch 13 Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen von der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert<sup>36</sup>.

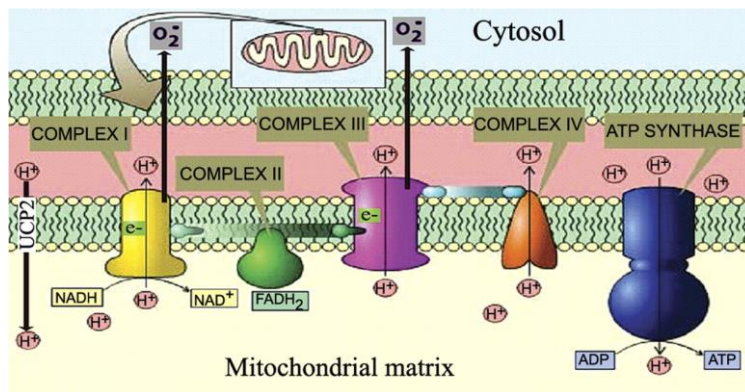


Abbildung 1.3: Darstellung der Komponenten der Elektronentransportkette<sup>37</sup>.

Viele Daten zu kongenitalen ETK-Defekten belegten die zentrale Rolle der ETK innerhalb des zellulären Energiehaushalts<sup>38</sup>.

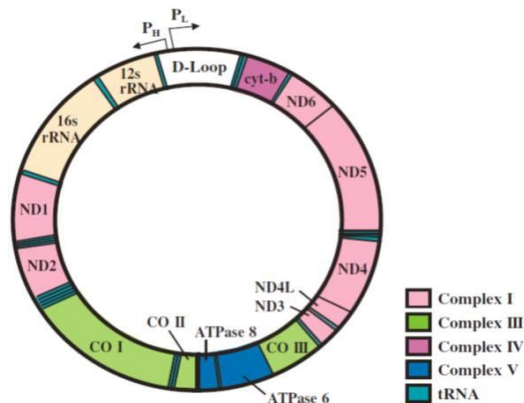
Das Verhalten einzelner ETK-Komponenten bei Herzinsuffizienz oder Hypertrophie wurde in verschiedenen Modellen beschrieben. Die dazugehörigen Daten sind jedoch teilweise widersprüchlich. Für insuffiziente Herzen wurden reduzierte Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I bis IV beschrieben<sup>39</sup>. Weiterhin zeigten sich in hypertrophierten Rattenherzen eine Reduktion der Proteinexpression von Untereinheiten der Komplexe II und V, während die Untereinheiten der Komplexe I, III und IV eine Erhöhung der Proteinexpression aufwiesen<sup>40</sup>. Andererseits zeigten Studien, dass in druckbelasteten Herzen ohne Anzeichen von HF keine signifikante Verminderung der Atmungskettenaktivitäten stattfand<sup>41</sup>.

Die Datenlage zum Einfluss von E2 auf die ETK im gesunden sowie im druckbelasteten Myokard ist begrenzt. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass E2-Rezeptoren auch intramitochondrial lokalisiert sind<sup>23</sup>. Nilsen et al. wiesen östrogene Wirkungen auf die ETK im Gehirn von OVX-Ratten nach. Demnach zeigte sich infolge einer Östrogenbehandlung eine Steigerung der Proteinexpression und Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten COX I bis IV, sowie die Expression der ATP-F1-Synthase-Untereinheiten alpha und beta<sup>42</sup>.

#### 1.4.2 Regulation der ETK-Synthese und die Rolle Östrogens

Die Biogenese der mitochondrialen ETK wird durch mehrere metabolische Regulatoren koordiniert. Dazu zählen die nuclear respiratory factors (NRF's 1 und 2)<sup>43</sup>. Die NRF's führen zur Aktivierung der Transkription der Mehrheit der Gene von Untereinheiten, aus denen sich die fünf Komplexe der ETK zusammensetzen<sup>44</sup>. Daneben wirken NRF-1 und -2 als Stimulatoren der mtDNA-vermittelten ETK-Biogenese, indem sie die Transkription des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (Tfam) anregen<sup>45</sup>. Tfam gilt als wichtiger Transkriptionsfaktor der mtDNA und reguliert gemeinsam mit weiteren

Transkriptionsfaktoren wie TFB1M und TFB2M die Biogenese der insgesamt 13 mitochondrial kodierten Untereinheiten der ETK-Komplexe<sup>45</sup>. Abbildung 1.4 stellt die auf der mtDNA lokalisierten Gene schematisch dar.



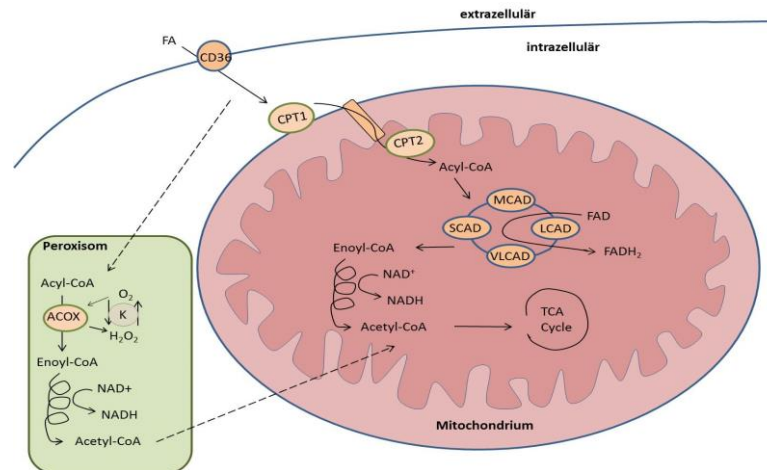
**Abbildung 1.4: Das mitochondriale Genom<sup>46</sup>.** Die Abbildung zeigt die Lokalisation von 13 mRNA, 2 rRNA (12s und 16s) und 21tRNA kodierenden Genen. Die mRNA kodierenden Gene sind farblich den entsprechenden Atmungskettenkomplexen zugeordnet. P<sub>H</sub>, Promotor für die Transkription des schweren Stranges; P<sub>L</sub>, Promotor für die Transkription des leichten Stranges.

E2-Wirkungen auf die Regulatoren der ETK-Synthese konnten Mattingly und Kollegen aufzeigen. Sie wiesen nach, dass E2 in weiblichen humanen MCF-7-Zellkulturen die NRF-1-Transkriptionsrate steigerte und dies mit erhöhter mitochondrialer Biogenese einherging<sup>47</sup>. Neben der NRF-1-Transkription waren auch jene von Tfam und die mtDNA-Replikation nach E2-Behandlung gesteigert. Dieser Effekt wurde nach Ausschaltung von NRF-1 nicht mehr beobachtet. Dies weist daraufhin, dass E2 in der Regulation der mtDNA-vermittelten ETK-Biogenese vornehmlich über NRF-1 agiert<sup>47</sup>.

### 1.4.3 Der Fettsäurestoffwechsel

Wie oben beschrieben stellen Fettsäuren (FA) die Hauptenergiequelle des Herzens unter Normalbedingungen dar. Der FA-transport und -abbau wird durch eine Vielzahl an Transportern und Enzymen kontrolliert. Der Import langkettiger Fettsäuren in die Zelle wird durch Fettsäuretransporter wie CD36 gesteuert<sup>48</sup>. Daraufhin findet eine Veresterung mit Coenzym A (CoA) statt. Anschließend können die FA zur FAO in Mitochondrien befördert werden. Dieser Prozess erfordert im Falle langkettiger FA die Carnitin-Palmitoyltransferasen (CPT's). CPT1 erzeugt dabei aus Carnitin und Acyl-CoA Acyl-Carnitin, welches daraufhin über die Carnitin-Acylcarnitin-Translocase in die mitochondriale Matrix überführt wird<sup>49</sup>. Hier katalysiert CPT2 die Reaktion von Acyl-Carnitin zu Carnitin und Acyl-CoA<sup>50</sup> zur weiteren Prozessierung der FA im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation. Je nach Länge der FA beteiligen sich verschiedene Dehydrogenasen an der Degradierung der FA-Ketten. Dazu gehören die Medium Chain Acyl CoA Dehydrogenase (MCAD), Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD) und Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD). Die auf diese Weise sukzessiv gewonnenen

Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> leiten die energiereichen Elektronen an die ETK weiter. Das verbleibende Acetyl-CoA wird dem Zitratzyklus zugeführt (siehe Abbildung 1.5). Neben der  $\beta$ -Oxidation innerhalb der mitochondrialen Matrix findet auch eine peroxisomale FAO statt. Der reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses Stoffwechselwegs ist die Oxidierung von Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Oxidase (ACOX) zu 2-Trans-Enoyl-CoA mit Reduktion FAD zu FADH<sub>2</sub>. Nebenprodukt dieser Reaktion ist Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>51</sup>.



**Abbildung 1.5 Schematische Übersicht des mitochondrialen und peroxisomalen Fettsäuremetabolismus.**

#### 1.4.4 Regulation des Fettsäurestoffwechsels und die Rolle Östrogens

Die Regulation der Transkription im Fettsäurestoffwechsel wird maßgeblich durch die Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ ), die zur Familie der ligandenaktivierten nukleären Rezeptoren gehören, bestimmt<sup>52</sup>. Alle PPAR-Typen lassen sich durch FA aktivieren und binden in Form eines Heterodimers mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) das entsprechende responsive Element (PPRE)<sup>53</sup>. Dieses PPRE befindet sich in Promoter-Regionen von Zielgenen, die in Prozesse des FA-Metabolismus wie peroxisomale und mitochondriale  $\beta$ -Oxidation involviert sind<sup>52</sup>. Die PPAR-Isoformen sind unterschiedlich auf die Gewebe verteilt und verschieden stark angereichert<sup>54</sup>. PPAR $\alpha$  ist hauptsächlich in Herz, Leber, Niere und Skelettmuskel exprimiert<sup>55</sup>. Zu den PPAR $\alpha$ -Zielgenen in der FAO zählen unter anderem CD36, CPT-1<sup>56</sup> und CPT-2<sup>57</sup>, MCAD<sup>58</sup>, LCAD<sup>59</sup>, ACOX-1<sup>56</sup> und die Entkopplungsproteine (UCP's) 2 und 3<sup>60,61</sup>. PPAR $\beta/\delta$  wird ubiquitär exprimiert und ist im Herzen und zahlreichen anderen Geweben in hohen Mengen vorhanden<sup>54</sup>. Seine Wirkungen auf den Fettsäuremetabolismus sind denen von PPAR $\alpha$  ähnlich<sup>58</sup>. So überlappen die Zielgenspektren beider nukleären Rezeptoren deutlich<sup>62</sup>. Auch PPAR $\gamma$  koordiniert Fettsäureimport und -abbau, ist vermehrt im Fettgewebe repräsentiert und in geringerem Ausmaß im Herzmuskel<sup>63</sup>.



---

Als wichtiger Ko-Aktivator der PPAR's gilt der peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )<sup>64</sup>, für den eine zentrale Bedeutung in der Regulation der myokardialen Lipidhomöostase beschrieben wurde. Darüber hinaus initiiert PGC-1 $\alpha$  durch Stimulation der NRF-Transkription die Biogenese von Untereinheiten der ETK-Komplexe<sup>65</sup>. Die höchste PGC-1 $\alpha$ -Expression findet sich im Herzmuskel und in braunem Fettgewebe<sup>66</sup>.

Daten zu E2-Wirkungen und Geschlechterunterschieden (GU) in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels bei MH sind kaum vorhanden. Die Existenz östrogen-responsiver Elemente (ERE) in den Genen aller drei PPAR-Isoformen weist auf einen möglichen Einfluss des Östrogens auf die FAO-Regulation hin<sup>67</sup>. In einem PPAR $\alpha$ KO-Modell wurde die Relevanz von Östrogen und GU innerhalb des Fettsäuremetabolismus hervorgehoben: CPT-1-Hemmung führte zu hepatischer und kardialer Lipidakkumulation und in 100% der männlichen Tiere zum Tod, während nur 25% der Weibchen verstarben. Eine vorausgegangene E2-Behandlung konnte die gesteigerte Mortalität der Männchen signifikant verringern<sup>59</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Ovariectomie zur Reduktion der PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in Aortengewebe führte, während eine E2-Behandlung die Proteinexpression erhöhte. Die E2-vermittelte PPAR $\gamma$ -Steigerung war dabei vasoprotektiv, da sie zu einer signifikant verminderten Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führte und die durch Ovariectomie gestörte vasodilatatorische Endothelfunktion signifikant verbesserte<sup>68</sup>.

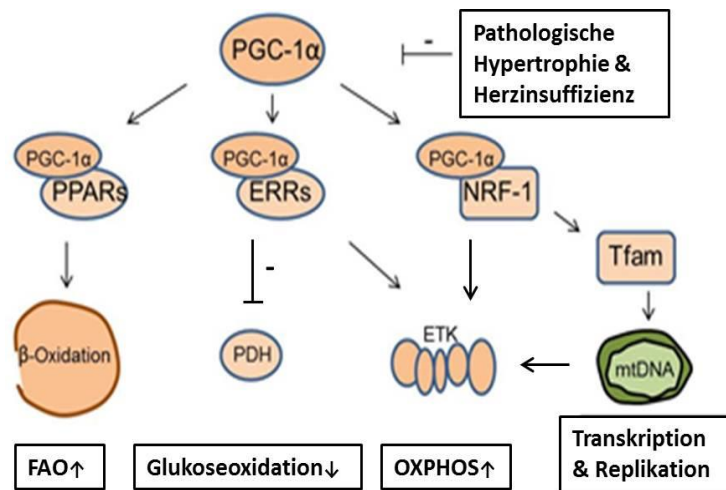
#### **1.4.5 Metabolische Veränderungen bei Hypertrophie**

Bei MH liegt ein modulierter Energiestoffwechsel vor<sup>48</sup>. Ein Anhaltspunkt in der Erforschung der Ursachen einer mechanischen Dysfunktion des Herzens ist daher die Theorie eines kardialen Energiemangels<sup>35</sup>. Demnach übersteigt der myokardiale Bedarf an ATP bei chronisch erhöhter Arbeitslast die Kapazität, ATP zur Verfügung zu stellen. Daraus folgt eine gestörte mechanische Herzfunktion und ein Fortschreiten der MH zur HF<sup>69</sup>. Weiterhin wurde ein Wechsel der Substratpräferenzen mehrfach als metabolisches Charakteristikum der HF beschrieben<sup>70</sup>. So findet sich im kardialen Stoffwechsel bei HF häufig eine Reduktion der FAO bei gesteigerter Glukoseoxidation.

In diesem Zusammenhang wurde vielfach vom Wechsel der Substratpräferenzen von FA hin zu Glukose bei Hypertrophie und HF berichtet<sup>71</sup>. Bislang wird kontrovers diskutiert, ob dieser Prozess als günstig oder maladaptiv zu bewerten ist<sup>72</sup>. Dem Schlüsselregulator PGC-1 $\alpha$  wird eine wichtige Rolle im Prozess der metabolischen Umstrukturierung zugeschrieben, da bei MH und HF häufig eine Minderung der PGC-1 $\alpha$ -Expression beobachtet wurde (siehe Abbildung 1.6). Dabei wirkt sich diese über eine gedrosselte PPAR-Aktivierung<sup>64</sup> auf die FAO aus. Weiterhin führt der PGC-1 $\alpha$ -Mangel über die NRF-



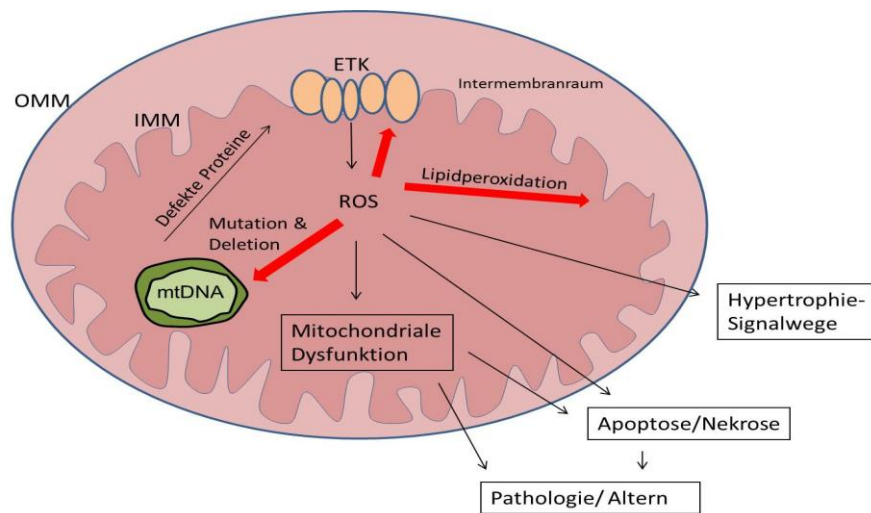
Tfam-Achse zur Reduktion der ETK-Kapazität<sup>73</sup>. Ob die MH-assoziierten Veränderungen des Stoffwechsels Geschlechterunterschiede aufweisen und .inwieweit diese durch Östrogen vermittelt werden, ist bislang unzureichend geklärt.



**Abbildung 1.6 Signaltransduktionswege von PGC-1 $\alpha$ , adaptiert von Finck und Kelly (2007)<sup>34</sup>.** OXPHOS = oxidative Phosphorylierung. Dieses Schema zeigt die Stoffwechselwirkungen von PGC-1 $\alpha$ -induzierten Koregulatoren in kardialen Myozyten. Über die PPARs stimuliert PGC-1 $\alpha$  die FAO. Durch die PGC-1 $\alpha$ -vermittelte Aktivierung von *estrogen related receptors* (engl., ERRs) und NRF-1 wird indirekt die Oxphos durch Erhöhung der Expression von ETK-Komponenten gesteigert. Gleichzeitig inhibieren die ERRs über eine PDH-Herabregulation die Glukoseoxidation. Bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz ist die PGC-1 $\alpha$ -Expression vermindert und die oben genannten Effekte sind auf den Energiemetabolismus reduziert.

## 1.5 Antioxidative Enzyme bei MH und die Rolle des Östrogens

Eine Reihe von Studien weist auf die Bedeutung von oxidativem Stress in der HF-Pathogenese hin<sup>36,46</sup>. Dieser ist dadurch charakterisiert, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) über das physiologische Maß hinaus akkumulieren. Die übermäßige ROS-Anreicherung führt zu zahlreichen pathologischen Veränderungen, die auch bei HF vorzufinden sind (siehe Abbildung 1.7). Dazu zählen Kardiomyozytenhypertrophie, Fibroseentwicklung, Zelltod durch Nekrose und Apoptose<sup>74</sup>, sowie mtDNA-Schädigung mit daraus resultierender Störung der ETK-Synthese und mitochondrialer Dysfunktion<sup>46</sup>. Es wird angenommen, dass die ETK selbst zu den Hauptquellen der ROS zählt<sup>75</sup>. Daher bedarf es funktionstüchtiger antioxidativer Systeme, um die ROS-Produktion in einem physiologischen Gleichgewicht zu halten.



**Abbildung 1.7: Überblick über die mitochondriale ROS-Produktion; adaptiert von Murphy, 2009<sup>76</sup>.** ETK = Elektronentransportkette; ROS = Reaktive Sauerstoffspezies; mtDNA = mitochondriale DNA; IMM = innere Mitochondrienmembran; OMM = äußere Mitochondrienmembran.

Superoxiddismutasen sind maßgeblich an der antioxidativen Kapazität des Myokards beteiligt. Es sind 3 SOD-Isoformen bekannt, die sich auch in ihrer Lokalisation unterscheiden. SOD1: intrazellulär<sup>77</sup>, SOD2: mitochondrial, SOD3: extrazelluläre<sup>78</sup>. Von besonderer Bedeutung ist die mitochondrial vorkommende Isoform SOD2, auf welche 90% der SOD-Aktivität der Kardiomyozyten zurückzuführen sind<sup>79</sup>. SOD's katalysieren die Reaktion des schädlichen höchst reaktiven Superoxidradikals ( $O_2^-$ ), das zum Beispiel an der ETK generiert wurde, zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )<sup>80</sup>. Ein weiteres ROS-detoxifizierendes Enzym ist die Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH2). ALDH2 dient der Metabolisierung reaktiver Aldehyde wie 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal (4-HNE), die bei Reaktionen von Hydroxylradikalen ( $OH^\cdot$ ) entstehen und bei Hypertrophie zur Schädigung mitochondrialer Proteine beitragen<sup>81</sup>. Es konnte für Kardiomyozytenkulturen gezeigt werden, dass eine  $\alpha$ -Liponsäure-vermittelte ALDH2-Aktivierung durch die Senkung der ROS-Last und der Apoptose-Rate kardioprotektive Effekte bei Hypoxie und Reoxygenierung vermittelt<sup>81</sup>. Weiterhin wurde die Reduktion ischämischer Schäden in Rattenherzen um bis zu 60% durch die Administration des ALDH2-Agonisten Alda-1 beschrieben<sup>82</sup>. Auch Entkopplungsproteinen (UCP's) werden ROS-mindernde Effekte zugeschrieben. Eine ihrer Funktionen besteht darin, die ETK als wesentliche Quelle für Superoxide<sup>83</sup> zu entkoppeln<sup>84</sup>. Dabei werden durch die ETK in den mitochondrialen Intermembranraum gepumpte Protonen an der ATP-Synthase vorbei in die mitochondriale Matrix zurückgeführt (siehe Abbildung 1.3). Dies senkt die Triebkraft des Protonengradienten und das Potenzial über der inneren Mitochondrienmembran, was schließlich zu einer geringeren Superoxidproduktion führt<sup>84</sup>.

Östrogene Effekte auf die Expression von SOD2 und anderen antioxidativen Enzymen wurden bereits beschrieben<sup>85</sup>. Es wurde gezeigt, dass die SOD2-Expression in hepatischen Mitochondrien weiblicher Ratten deutlich höher war, als die von männlichen

---

Tieren<sup>86</sup>. Deutliche GU fanden sich in der ALDH2-Aktivität von Rattenherzen<sup>87</sup>. Während eine höhere Aktivität bei Weibchen kardioprotektiv unter Ischämie- und Reperusionsbedingungen wirkte, wurde bei Männchen ein signifikant größeres Infarktareal nachgewiesen. Durch E2-Behandlung der Männchen ließ sich die Größe des Infarktareals reduzieren. OVX-Weibchen wiesen eine geringere ALDH2-Aktivität und ein größeres Infarktareal als nicht-OVX-Tiere auf<sup>87</sup>. Ob es bei MH GU in der Gen- und Proteinexpression antioxidativer Enzyme gibt und welche Bedeutung E2 dabei spielt, kann aufgrund bis dato fehlender Untersuchungen nicht konkretisiert werden.

## **1.6 Ziele und Fragestellung**

Das Ziel dieser Studie war es, Geschlechterunterschiede (GU) im mitochondrialen Metabolismus des Myokards unter physiologischen Bedingungen und bei Myokardhypertrophie zu identifizieren.

Weiterhin sollte der Einfluss des Östrogens auf die Ausprägung möglicher GU im mitochondrialen Metabolismus überprüft werden.

Die Studie wurde dabei unter folgenden Fragestellungen durchgeführt:

1. Gibt es Geschlechterunterschiede in der Gen- und Proteinexpression des mitochondrialen Metabolismus des linksventrikulären Myokards unter:
  - a) physiologischen und
  - b) pathologischen Bedingungen linksventrikulärer Hypertrophie (LVH)?
  
2. Sind diesbezüglich eventuell auftretende Geschlechterunterschiede E2-vermittelt?

---

## 2 Material

### 2.1 Gewebe

Für die Expressionsanalysen dieses Projekts wurde jeweils der linke Ventrikel von weiblichen und männlichen Mäusen des Stammes C57Bl6 der Art *mus musculus* herangezogen. Die Mäuse wurden bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit je nach Gruppe einer transversalen Aortenkonstriktion oder Scheinoperation und / oder Ovariectomie unterzogen und entsprechend mit Phytoöstrogen-freiem Futter mit oder ohne Östrogenanreicherung behandelt (siehe Punkt 3.1). Zu Beginn des Projekts lag das Alter der Tiere zwischen neun und zehn Wochen.

### 2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien

Substanz	Firma
Albuminstandard 2 mg/mL	Pierce (Rockford, IL, USA)
APS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BCA	Pierce (Rockford, IL, USA)
Chloroform/ Trichlormethan	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
ECL	Biozym Biotech (Wien, Österreich)
Entwickler	Agfa Healthcare NV (Mortsel, Belgium)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Fixierer	Agfa Geveart AG (Dübendorf, Schweiz)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (CA, USA)
IGE PAL	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phostop	Roche (Mannheim, Deutschland)
Ponceau S-Solution	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2-Propanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaF	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NaCl	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natrium-Deoxycholat	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Na <sub>3</sub> VO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
RNase Away	Molecular BioProducts (San Diego, CA, USA)
RNase Inhibitor	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNAzol B/RNABee	Tell Test Inc. (Friendswood, TX, USA)
Rotiload Gelladepuffer, reduzierend	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SYBRGreen	Applied Biosystems (CA, USA)
Temed	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### 2.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blocking Reagenz	5% Magermilchpulver in 1xTBS-T Puffer	
Elektrophoresepuffer	25mM Tris	
	250mM Glycin	
	3,5mM SDS	
Proteinlysis Puffer	Ripa-Puffer	50mM Tris, pH 7,5
		150mM NaCl
		IGE-PAL CA-630
		10% Na-Deoxycholat
	1x Phostop	
	1x Complete Protease Inhibitor Cocktail	
	1mM NaF	
	1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>3</sub>	
	Stripping Puffer	25mM Glycin
3,5mM SDS		
pH 2 mit Schwefelsäure (37%) eingestellt		
TBS-T Puffer	137mM NaCl	
	20mM Tris	
	0,1% Tween 20 (v/v)	
Transferpuffer	193,7mM Glycin	
	25mM Tris	
	20%	

Trenngelpuffer	1,5M Tris, pH 8,8
Sammelgelpuffer	1M Tris, pH 6,8
<b>SDS-Acrylamidgele</b>	
Trenngel (8%, 10%, 12%)	Tris (pH 8,8);10% SDS;10% APS; 10%Temed
Sammelgel (4%)	Tris (pH 6,8); 10%SDS; 10% APS; 10% Temed;

## 2.4 Geräte

Gerät	Firma
Abzug	Köttermann (Uetze, Deutschland)
Blotting-System	Biostep (Jahnsdorf, Deutschland)
Chemilumineszenz-Scanner Curix 60	Agfa (Köln, Deutschland)
Elektrophorese-System	Biostep (Jahnsdorf, Deutschland)
Homogenisator Fast Prep FP 120	Thermo Savant Thermo Inc. (USA)
Hybridisierungsöfen	Bachofer (ReuTLingen, Deutschland)
Magnetrührer	Bibby Scientific (Staffordshire, Vereinigtes Königreich)
Master Cycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Multipipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spektrophotometer	Nanodrop Technologies (Wilmington, USA)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA)
Präzisionswaage	Kern und Sohn (Balingen, Deutschland)
SDS-Gelsystem	BioRad (Hercules, CA, USA)
Reinstwasseranlage	Hartmann (Hainichen, Deutschland)
Rocking Platform	Biometra (Göttingen, Deutschland)
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems (CA, USA)
Schüttler IKA Vibrax VXR	Janke und Kunkel (Staufen, Deutschland)
SDS-Gelsystem	BioRad (Hercules, CA, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge Mini Star Silverline	VWR international (Radnor, Pennsylvania, USA)
Tischzentrifuge Poly Labo	Tomy Kogyo CO. (Tokyo, Japan)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)

Vortexer Reax 2000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

## 2.5 Software

Name	Firma
ND-1000 V3.5.2	Nanodrop Technologies (Wilmington, USA)
ABI 7300 Software	Applied Biosystems (CA, USA)
Image J - Bildanalyse Software	Image J
Microsoft Office 2010	Microsoft (USA)
BCA- Microplate Manager	BioRad (Hercules, CA, USA)
SPSS Statistics 20	IBM

## 2.6 Sonstiges

Sonstige Verbrauchsmaterialien	
Medical X-Ray Film	Fujifilm Europe (Düsseldorf, Deutschland)
Combitips	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5ml; 2,0ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Falconröhrchen	BD Biosciences (Erembodegem, Belgium)
Kunststoffpipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kunststoffpipettenspitzen mit Filter	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
Lysing Matrix D tubes	QBIogene (Heidelberg, Deutschland)
Mikrotiterplatten Rotilabo	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nitrozellulose, Hybond-ECL	Amersham Biosciences (NJ, USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Applied Biosystems (CA, USA)
96-Lochplatten	Applied Biosystems (CA, USA)
Serologische Rotilabo Pipetten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Enzyme	
MultiScribe Reverse Transcriptase	Applied Biosystems (CA, USA)
Taq Polymerase	Applied Biosystems (CA, USA)
Molekulare Marker	
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Pierce (Rockford, IL, USA)
Kommerzielle Kit-Systeme	
BCA protein assay Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
ECL Detektionskit	Amersham Biosciences, (NJ, USA)

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (CA, USA)
--	------------------------------

## 2.7 Oligonukleotide (Primer)

Die hier aufgeführten Primerpaare wurden von den Firmen BioTeZ und Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland synthetisiert.

Identifizierung	Primer 5' → 3'	AmplifikaTLänge
HPRT Forward	GCT TTC CCT GGT TAA GCA GTA CA	78
HPRT Reverse	ACA CTT CGA GAG GTC CTT TTC AC	
PGC1 $\alpha$ Forward	GAA AGG GCC AAA CAG AGA GA	63
PGC1 $\alpha$ Reverse	GTA AAT CAC ACG GCG CTC TT	
COX5 $\alpha$ Forward	GTC AGC CTC AGC CAG TGC	143
COX5 $\alpha$ Reverse	TAG CAG CGA ATG GAA CAG AC	
COX7A2 Forward	TAT TTG CCA CAC CAA CCA AA	114
COX7A2 Reverse	TCA GGT GGA AAC CAT CAG C	
ATP5K Forward	TCA GGT CTC TCC ACT CAT CAA GT	132
ATP5K Reverse	TTC TTT TCC TCC GCT GTC AT	
Tfam Forward	AGG GAG CTA CCA GGA GCA GA	108
Tfam Reverse	TGA CTT GGA GTT AGC TGC TCT TT	
Glut 1 Forward	TTG TTG TAG AGC GAG CTG GA	164
Glut 1 Reverse	TTC AAA GAA GGC CAC AAA GC	
Glut 4 Forward	GTC GGG TTT CCA GCA GAT	136
Glut 4 Reverse	GGC ATT GAT AAC CCC AAT GT	
PFKm Forward	TTG AGG AAC CCT TCA CCA TT	60
PFK Reverse	TCT TCT GCA CCA GAT GTT CAA	
NRF 1 Forward	AGC ACC TTT GGA GAA TGT GGT	163
NRF 1 Reverse	TGG GAT AAA TGC CCG AAG CTG	
HK 2 Forward	TTC ACC TTC TCC TTC CCT TG	68
HK 2 Reverse	CCC TTT GTC CAC TTG AGG AG	
GAPDH Forward	ATG GTG AAG GTC GGT GTG A	84
GAPDH Reverse	AAT CTC CAC TTT GCC ACT GC	
ND1 Forward	AGC CTG ACC CAT CAT AGC CAT AA	85
ND1 Reverse	TTC TCC TTC TGT CAG GTC GAA	
COX3 Forward	TAG CCT CGT ACC AAC ACA CAT GA	66
COX3 Reverse	AGT GGT GAA ATT CCT GTT GGA	



18S rRNA Forward	CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT	121
18S rRNA Reverse	TTC CAA TTA CAG GGC CTC GA	
GAPDH Forward	TCA AGA AGG TGG TGA AGC AG	116
GAPDH Reverse	CAT CGA AGG TGG AAG AGT GG	
PPAR $\gamma$ Forward	TTC AGA AGT GCC TTG CTG TG	130
PPAR $\gamma$ Reverse	TCA GCA GAC TCT GGG TTC AG	
PPAR $\alpha$ Forward	CAG GGT ACC ACT ACG GAG TTC AC	101
PPAR $\alpha$ Reverse	GCA GCT CCG ATC ACA CTT GTC	
PPAR $\delta$ Forward	AAG ACA AAC CCA CGG TAA AGG	103
PPAR $\delta$ Reverse	CAT GAC TGA CCC CCA CTT G	
CPT-1 Forward	GCA TAA ACG CAG AGC ATT CC	117
CPT-1 Reverse	AGT GTC CAT CCT CTG AGT AGC C	
CPT-2 Forward	CCA AAG AAG CAG CGA TGG	94
CPT-2 Reverse	TAG AGC TCA GGC AGG GTG A	
LCAD Forward	GCT TAT GAA TGT GTG CAA CTC C	81
LCAD Reverse	CCG AGC ATC CACGTA AGC	
MCAD Forward	CAG ATT TTC GGA GGC TAT GGA TT	219
MCAD Reverse	ACG AGC TAT GAT CAG CCT CTG AA	
CD36 Forward	CCT CTG ACA TTT GCA GGT CCA T	133
CD36 Reverse	AAA CAG TGG TTG TCT GGG TTC TG	
ACOX-1 Forward	TTC TCA CAG CAG TGG GAT TC	132
ACOX-1 Reverse	CCC GAC TGA ACC TGG TCA TA	

## 2.8 Antikörper

Identifizierung	Verdünnungsfaktor	Lösungsmittel	Hersteller
Primäre Antikörper			
PGC 1 $\alpha$	1:1000	5% Magermilch	Abcam
ALDH2	1:400	3% Magermilch	Santa Cruz
OXPPOS	1:1000	1% Magermilch	Abcam
SOD2	1:1000	5% Magermilch	Santa Cruz
PPAR $\alpha$	1:200	1,5% Magermilch	Santa Cruz
PPAR $\beta$	1:200	1,5% Magermilch	Santa Cruz
4-HNE	1:500	1,5% Magermilch	Abcam
ER $\beta$	1:1500	5% Magermilch	Acris
ER $\alpha$	1:750	3% Magermilch	Santa Cruz

---

Sekundäre Antikörper			
Donkey anti goat	1:10000	5% BR	Santa Cruz
Donkey anti rabbit	1:10000	5% Magermilch	Dianova
Goat anti mouse	1:5000	1% Magermilch	Santa Cruz

---

## 3 Methoden

### 3.1 Studiendesign

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente basieren auf Tierversuchen, die gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben G0027/11 durchgeführt wurden. Die Genehmigung erfolgte durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin.

Die vorliegende Arbeit ist Teilprojekt einer Studie zum Einfluss von E2 und ER $\beta$  auf den kardialen Metabolismus und die mitochondriale Respiration bei MH. Sie basiert auf Expressionsstudien von Genen, Enzymen und Proteinen, die an kardialen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Die Gruppeneinteilung und die Tierzahlen sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

**Tabelle 3.1: Tiergruppen**

Nummer	Tiergruppe	Anzahl der Tiere
1	Placebo Sham männlich	10
2	E2 Sham männlich	8
3	Placebo TAC männlich	8
4	E2 TAC männlich	9
5	Placebo Sham weiblich	8
6	E2 Sham weiblich	7
7	Placebo TAC weiblich	8
8	E2 TAC weiblich	10
9	OVX Sham Placebo weiblich	10
10	OVX Sham E2 weiblich	10
11	OVX TAC Placebo weiblich	8
12	OVX TAC E2 weiblich	11

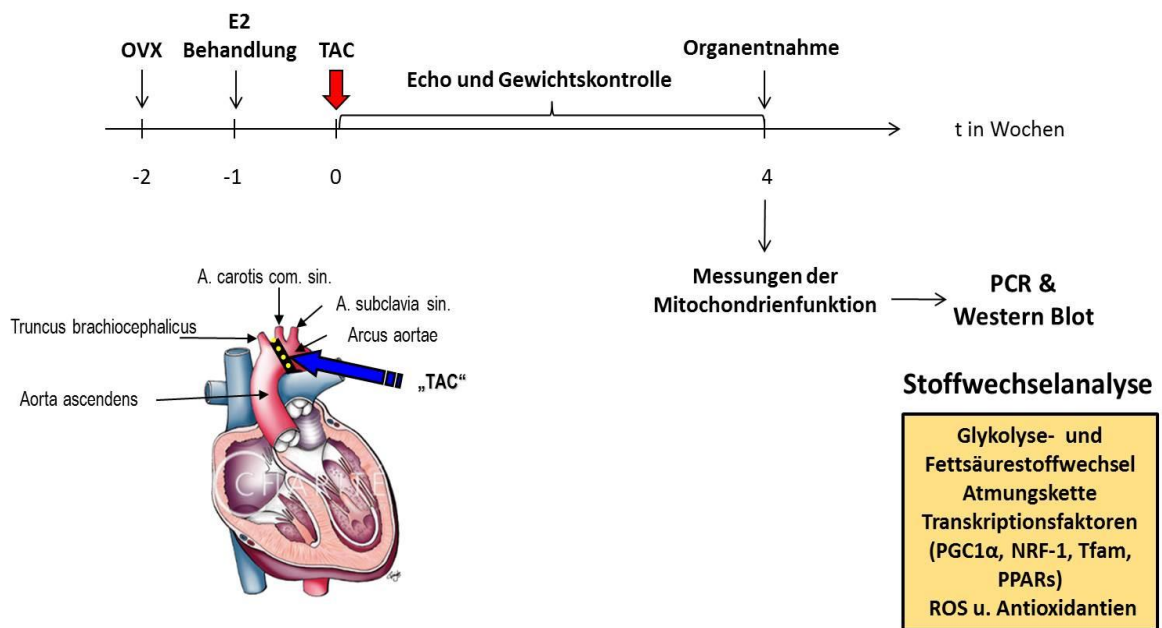
Von diesen Tierzahlen abweichende Probenzahlen (n) in den Abbildungen des Ergebnisteils sind auf Fehler in der Versuchsdurchführung, wie einzelne Pipettierfehler, Probenkontamination, Blot-Unreinheiten zurückzuführen. Die dazugehörigen Messwerte wurden folglich als unverwertbar eingestuft und ausgeschlossen.

Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten phytoöstrogenfreies Futter. Dieses wurde als Placebo (Plac) definiert. Die E2-Behandlung erfolgte durch Anreicherung der phytoöstrogenfreien Nahrung mit 4,32mg 17 $\beta$ -Östradiolbenzoat (E2) pro kg Futter. Es wurde eine mittlere Futteraufnahme von 3 mg pro Tier festgestellt, mit einer erwarteten

täglichen E2-Zufuhr von etwa 159µg/Tier/Tag<sup>88</sup>. Die E2-Behandlung wurde in den entsprechenden Gruppen eine Woche vor Induktion der transversalen Aortenkonstriktion (TAC) initiiert. Weiterhin wurden wöchentliche echokardiographische Untersuchungen und Gewichtskontrollen durchgeführt.

Die OVX-Gruppen wurden zwei Wochen vor TAC-Operation einer Ovariectomie unterzogen. Vier Wochen nach TAC-Induktion wurden die Herzen und weitere Organe sowie Blutproben entnommen. Ein Teil des Gewebes wurde zur Messung der mitochondrialen Funktion verwendet. Der Großteil des Myokardgewebes wurde bis zur weiteren Verwendung für die im Folgenden präsentierte Gen- und Proteinexpressionsstudie bei -80°C gelagert.

Die folgende Abbildung 3.8 gibt den Zusammenhang zwischen den in der vorliegenden Arbeit thematisierten Stoffwechselanalysen im Rahmen des Gesamtprojektes zur Untersuchung der Rolle myokardialer Mitochondrien bei drucklastinduzierter Myokardhypertrophie wieder. Vier Wochen nach TAC-Induktion wurden die Organe entnommen und Messungen der kardialen Mitochondrienfunktion ex vivo durchgeführt (Diese Daten werden in dieser Arbeit nicht dargestellt). Die Resultate der darauffolgenden Gen- und Proteinexpressionsanalysen sind im Ergebnisteil zusammengestellt.



**Abbildung 3.8 Studienablauf:** Überblick des Gesamtprojektes. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind die mit Hilfe von PCR und Western Blot analysierten Stoffwechselwege (im Bild rechts, orange unterlegt). TAC = transversale Aortenkonstriktion; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; OVX = Ovariectomie; E2 = 17β-Östradiol; PPAR = Peroxisome proliferator activated receptor; PGC1α = PPAR gamma coactivator 1α; NRF = nuclear respiratory factor; Tfam = transcription factor, mitochondrial; ROS = reaktive Sauerstoffspezies.

---

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 RNA-Isolierung aus Myokardgewebe**

Zur RNA-Isolierung wurde ausschließlich Gewebe des linken Ventrikels herangezogen. Die RNA von 20-30µg LV wurde mit Hilfe von „RNazol B“ nach Anweisungen des Herstellers extrahiert.

Zunächst wurden die gefrorenen Gewebestücke in die aus Keramikkügelchen bestehende Lysis Matrix D (QBIogene) überführt, mit 600µL „RNazol B“ versetzt und für 20s im Homogenisator (Fastprep 120, Thermosavant) mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Proben nach Zugabe weiterer 400µL „RNazol B“ für 5 Minuten zur Inkubation auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden die inkubierten Homogenisate bei 4°C und 2000 Umdrehungen pro Minute (U/min) heftig geschüttelt (IKA Vibrax VXR, Janke und Kunkel). Danach wurde pro 1mL geschüttelter Probenlösung 0,2mL Chloroform hinzugesetzt. Nach erneutem zweiminütigen Schütteln im Vortexer (Vortex Genie 2, Scientific Industries) und einer fünfminütigen Ruhephase auf Eis folgte eine Zentrifugation (Eppendorf) bei 4 °C und 14000 U/min über 10 min. Der auf diese Weise entstandene RNA-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem zum Überstand äquivalenten Volumen an Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 °C zur Fällung zwischengelagert. Am Folgetag wurde der nach erneuter Zentrifugation über 30min bei 4°C und 14000 U/min erhaltene Überstand vorsichtig dekantiert und die RNA-Pellets in zwei Schritten mit 80% Ethanol gewaschen und 20min luftgetrocknet. Schließlich wurde das RNA-Pellet mit 25-50µL DEPC-Wasser aufgenommen.

### **3.2.2 DNA-Isolierung aus Myokardgewebe**

Für die Aufschließung des Gewebes wurden jeweils etwa 10mg LV-Myokard in einem Eppendorfgefäß mit 350 µL Lysispuffer und 20µL Proteinase K (10 mg/mL) versetzt. Anschließend wurde das Lyse-Gemisch auf einem Heizblock bei 55°C und 400 rpm über Nacht inkubiert und danach bei Bedarf nochmals mit 20-35 µL Proteinase K für eine Stunde bei 55°C behandelt. Nach einer zehnminütigen Abkühlung auf Eis wurden den Suspensionen je 150 µL NaCL (5 mol/L) hinzugefügt. Die Lösungen wurden durch Inversion durchmischt und weitere 5min auf Eis gekühlt. Im Anschluss daran folgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm und 4°C, nach welchem der Überstand in neue 2mL-Eppendorfgefäße überführt wurde. Nach dem Hinzugeben von 2µL RNase A (10 mg/mL) wurden die Lösungen für 15 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden je 500µL Isopropanol addiert und durch Inversion gründlich vermischt. Nach stattgefundener Fällung erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt über 20 min bei 12000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die DNA-Pellets wurden mit 500 µL

eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurden der Überstand erneut entfernt. Die Pellets wurden für 10-15 min an der Luft getrocknet. Abschließend wurden die Pellets je nach Größe in 50-100µL PCR-Wasser resuspendiert.

### 3.2.3 RNA- und DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA- und DNA-Proben erfolgte mit Hilfe des Spektrophotometers ND-1000 (Nanodrop Technologies) und der Software ND-1000 V3.5.2.

### 3.2.4 Reverse Transkription

Nach erfolgreicher Konzentrationsbestimmung wurde die isolierte RNA durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden die RNA-Proben auf 125ng/µL verdünnt. Für jede cDNA-Synthese wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Zur Vorbereitung wurde ein Master Mix (High capacity cDNA Reverse Transkription Kit, Applied Biosystems (AB); RNase out, Invitrogen) hergestellt. Pro Reaktionsgefäß wurden 16µL Master Mix (siehe Tabelle 3.1) eingesetzt. Zu diesen 16µL wurden jeweils 4µL RNA hinzugefügt.

**Tabelle 3.2: Komponenten des Mastermix für die Reverse Transkription**

Komponente	Volumen in µL
<b>10x RT Buffer</b>	2,0
<b>25x dNTP Mix (100mM)</b>	0,8
<b>RT Random Primer</b>	2,0
<b>MultiScribe Reverse Transcriptase</b>	1,0
<b>RNase Inhibitor</b>	0,5
<b>DEPC-H2O</b>	9,7
<b>Gesamtvolumen pro Reaktion</b>	16

Der Ansatz wurde vorsichtig geschüttelt, kurz zentrifugiert und über 5 Minuten zur Inaktivierung der Enzymreaktion auf 95°C erhitzt (Thermomixer compact, Eppendorf). Zum Abschluss dieser Vorbereitungsschritte wurde der Master Cycler auf folgende Arbeitsbedingungen (Tabelle 3.3) programmiert:

**Tabelle 3.3: Arbeitsbedingungen des Master Cycler**

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt3	Schritt 4
<b>Temperatur</b>	25°C	37°C	85°C	4°C

<b>Zeit</b>	10min	120min	5s	∞
-------------	-------	--------	----	---

Schließlich wurden die Ansätze in den Master Cycler überführt und eine kontrollierte Reverse Transkription mit einer Dauer von 2½ Stunden gestartet. Nach Beendigung dieser cDNA-Synthese wurden die Proben auf 25ng/μL verdünnt und für die direkte Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

### 3.2.5 Realtime PCR

#### 3.2.5.1 mRNA-Quantifizierung

Die für die Messung ausgewählten Gene wurden mit Hilfe der Real Time PCR im Doppelansatz quantifiziert (7300 Real Time PCR System, AB). Hierfür wurde der *Power SYBR® Green Master Mix* (AB) nach Herstelleranweisungen verwendet. Nach Bestimmung der Eichgeraden für die zu untersuchenden Gene wurden die cDNA-Proben auf eine Konzentration von 0,39μL verdünnt. In der folgenden Tabelle (Tabelle 3.4) sind die Komponenten des Master Mix mit jeweiliger Volumenangabe pro Reaktion dargestellt:

**Tabelle 3.4: Komponenten des RT-PCR Mastermix + cDNA-Probe**

<b>Master Mix</b>		<b>Power SYBR® Green PCR Master</b>
		SYBR Green Farbstoff
<b>Primer FW</b>	1 μL	Taq Polymerase
<b>Primer RV</b>	1 μL	dNTPs
<b>Aqua dest.</b>	3 μL	MgCl <sub>2</sub>
<b>Power SYBR® Green</b>	10 μL	Puffer
<b>cDNA-Probe</b>	5 μL	Passive Referenz (ROX)

Forward und Reverse Primer wurden für alle Gene im Verhältnis 1:1 angesetzt, mit Ausnahme der Gene Glut 1 (FW:RV=1:3), NRF1 (FW:RV=3:1), NRF2 (FW:RV=3:1), MCAD (FW:RV=3:1), LCAD (FW:RV=1:3), PPAR δ (FW:RV=3:1). In diesen Fällen weichen die Volumina daher entsprechend vom Schema in Tabelle 3.4 ab. Die Primer-Konzentration betrug jeweils 5 pmol/μL. Mastermix und cDNA-Proben wurden auf 96-Lochplatten pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 μL pro Reaktion ergab. Nach kurzem Schütteln und Zentrifugieren bei 4°C in einer Plattenzentrifuge, wurden die Real Time PCR mit folgendem Zyklus-Protokoll gestartet:

- Denaturierung bei 95°C für 10 min
- 40 Zyklen Denaturierung bei 95°C für je 15 s
- Annealing (Anlagerung) der Primer

---

- Elongation (Strangsynthese) bei 60°C für 1 min.

Es wurden ausschließlich intronüberspannende Primer eingesetzt.

### 3.2.5.2 mtDNA-Quantifizierung

Die Bestimmung der Expression der mtDNA-kodierten Gene ND1 und COX3 und der Referenzgene GAPDH und 18S-rRNA erfolgte ebenfalls mittels des oben beschriebenen Systems der Real Time PCR und unter Verwendung des SYBR<sup>®</sup>Green-basierten Mastermix. Dabei wurden je Slot 1µL der DNA-Proben einer Konzentration von 0,01ng/µL eingesetzt. Vor jeder Verwendung wurde die DNA 30min im Thermomixer bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Primerpaare wurden jeweils im Verhältnis 1:1 verwendet. Dabei ergab sich folgendes Schema für die Komponenten einer Slot-Ladung:

**Tabelle 3.5 Mastermix RT PCR + DNA**

<b>FW</b>	1µL
<b>RV</b>	1µL
<b>SYBR Green<sup>®</sup></b>	10µL
<b>Aqua dest</b>	7µL
<b>DNA-Probe</b>	1µL

Es wurde das oben beschriebene Zyklus-Protokoll verwendet.

## 3.3 Biochemische Methoden

### 3.3.1 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Zur Proteinisolierung wurden myokardiale Gewebeproben des linken Ventrikels herangezogen. Diese wurden mit eiskaltem Proteinlysispuffer versetzt (siehe Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6: Komponenten des Proteinlysispuffers**

<b>Ripa-Puffer</b>	50mM Tris, pH 7,5 150mM NaCl IGE-PAL CA-630 10% Na-Deoxycholat
--------------------	---

**1x Phostop**

**1x Complete Protease Inhibitor Cocktail**

**1mM NaF**

**1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub>**



Zur mechanischen Aufschließung des Gewebes wurde Lysis Matrix D (QBIogene) eingesetzt, welche gemeinsam mit den Proben in den Homogenisator (Fastprep 120, Thermosavant) überführt wurde. Nach einer Homogenisierungsphase von 20 s wurde den Proben 10% SDS zugesetzt. Im Anschluss daran wurden alle Proben kurz mittels Vortexer geschüttelt und für 10 min bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Anschließend wurde der wässrige Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Eventuell auf der Oberfläche des Überstandes schwimmende Fettsuren wurden entfernt. Schließlich wurden je 2µL der aufbereiteten Proteinproben mit 18µL Wasser zur Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Protein Assay jeweils im Doppelansatz auf Mikrotiterplatten (Roth) pipettiert. Zu dem Volumen der 20µL Proben in 1:10 Verdünnung wurden 300µL Reaktionsgemisch (Reagenz A:Reagenz B=50:1) addiert. Schließlich wurde der Ansatz bei 37°C im Hybridisierungsofen inkubiert und die Extinktion bei 550nm Wellenlänge bestimmt. Als Negativkontrolle wurde der Proteinlysispuffer verwendet.

### 3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte mit Hilfe der SDS-Page. Folgende Komponenten (Tabelle 3.7) wurden zur Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet:

**Tabelle 3.7: Komponenten der SDS-Polyacrylamid-Gele**

<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Tris (pH 8,8)	Tris (pH 6,8)
10% SDS	10% SDS
10% APS	10% APS
10%Temed	10%Temed

Für eine saubere Trennung der Proteine wurden Polyacrylamid-Konzentrationen von 4% für das Sammelgel und je nach Größe der zu detektierenden Proteine 8-12% für das Trenngel gewählt. Als Medium der SDS-Page diente der Gelelektrophorese-Puffer. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei zunächst 60V zur Proteinausrichtung im Sammelgel und schließlich bei konstanter Spannung von 100V über etwa 3 Stunden bei 4°C.

### 3.3.3 Western Blot

Per Western-Blot-Verfahren wurden die Proteinbanden in den SDS-Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulosemembranen (NZM) übertragen. Dafür wurde ein Blot-System (Biostep) herangezogen. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 400mA und einer

---

Temperatur von 4°C in 1.5 Stunden vollzogen. Anschließend wurden die Proteinbanden auf der NZM zur Kontrolle der Transfereffizienz mit Ponceau S gefärbt, die Membran leicht gespült, luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### **3.3.4 Antikörperhybridisierung**

Nach erfolgtem Proteintransfer wurden die NZM in 5% Magermilch Blocking-Reagenz für 1h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, um unspezifische Protein-Antikörper-Interaktionen zu minimieren. Im nächsten Schritt fand die Antikörperhybridisierung mit dem jeweiligen Antikörper über Nacht bei 4°C statt. Lösungsmittel und Verdünnungsfaktor sind für jeden Antikörper spezifisch (siehe Punkt 2.8). Schließlich wurde die NZM in drei Waschgängen à 10 min mit TBS-T gewaschen und danach für 1h bei Raumtemperatur mit einem spezie-spezifischen „Meerrettich-Peroxidase“ („horseradish peroxidase“-HRP) gekoppelten Sekundäantikörper (siehe Punkt 2.8) behandelt. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal über 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen.

### **3.3.5 Detektion**

Zum Detektieren der Antigen-Antikörperkomplexe wurde ein Chemielumineszenz-Kit nach Standardprotokoll eingesetzt. Dabei katalysiert die an den Sekundäantikörper gebundene HRP die Luminoloxidation, die zu der für die Detektion entscheidenden Lumineszenz führt. Der Nachweis dieser Reaktionen erfolgte mit Hilfe von Audiographiefilmen (Medical X-Ray Film, Fuji Europe). Die Belichtungszeit der Filme lag jeweils zwischen 5 Sekunden und 1 Minute.

### **3.3.6 Stripping-Protokoll**

Im Stripping-Verfahren wird die NZM nach erfolgter Detektion für eine Wiederverwendung aufbereitet, indem die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Um dies zu erreichen, wurde die Membran in Stripping-Puffer für 30 min bei 51°C im Wärmeschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurde die NZM in 3 Waschgängen à 10 min gewaschen, zur Proteindarstellung erneut mit Ponceau S gefärbt und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

## **3.4 Normalisierung**

Zur Normalisierung der ausgewählten nukleär kodierten Gene wurden die Referenzgene HPRT, RPLP-0 und GAPDH herangezogen, wobei sich für GAPDH in allen Gruppen die stabilste Expression zeigte. In die Analyse der Proteinexpression wurden  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH und  $\beta$ -Actin als Referenzproteine herangezogen. Dabei wies GAPDH in allen

---

untersuchten Gruppen die stabilste Proteinexpression auf und wurde als Referenzprotein festgelegt.

### **3.5 Statistik**

Die statistischen Auswertungen der Ergebnisse von Gen- und Proteinexpression wurden unter Verwendung des Statistik-Programms IBM SPSS Statistics 20 durchgeführt. Dabei wurden die männlichen, weiblichen und OVX-Gruppen jeweils separat analysiert. Nach Prüfung der Werte auf Normalverteilung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewandt und bei Wechselwirkung der Post-hoc-Test Tukey B angeschlossen. Weiterhin wurde ein Mittelwertevergleich der drei Sham-Gruppen untereinander durchgeführt, um Unterschiede in der Basalexpression der Gene und Proteine zu ermitteln. P-Werte von <0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (MW  $\pm$  SEM).

---

## 4 Ergebnisse

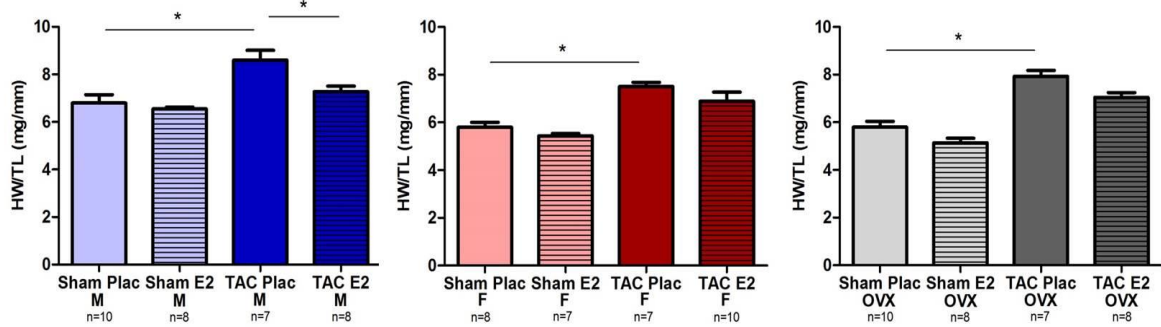
### 4.1 Parameter der kardialen Funktion und Hypertrophie

Die Versuchstiere wurden in wöchentlichen Abständen zur Bestimmung von Hypertrophie- und Herzfunktionsparametern echokardiographisch untersucht. Im Folgenden werden ausschließlich die linksventrikuläre Masse (LVM), das Herzgewicht (HW, *engl. heart weight*) und die Ejektionsfraktion (EF) vier Wochen nach TAC-Induktion dargestellt.

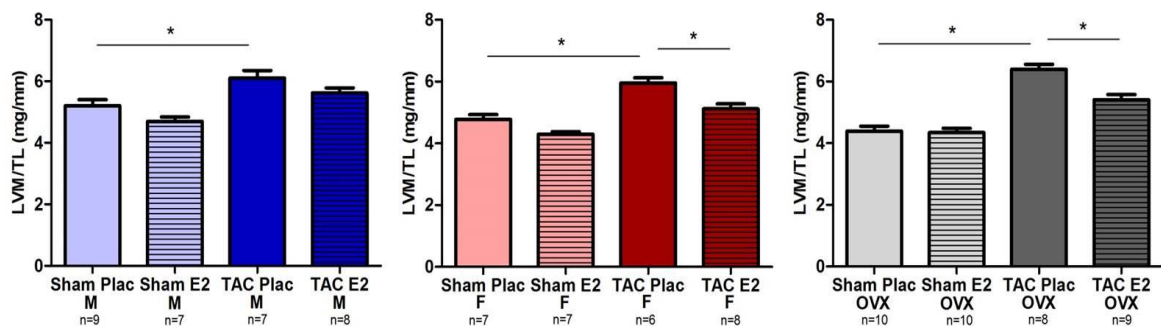
Die Messung der Herzgewichte (HW) ist für die Bestimmung der MH-Entwicklung essentiell. Das Auswiegen der HW erfolgte nach der Organentnahme in Woche vier. In den Wochen vor der Organentnahme erfolgten echokardiographische Berechnungen der linksventrikulären Masse (LVM). Dabei wurde die LVM durch die Messung von Wanddicke und Durchmesser des linken Ventrikels bestimmt. Über die Zunahme der LVM konnte auf den Grad der Hypertrophie geschlossen werden. Die LVM und HW wurden jeweils über das Verhältnis zur Tibialänge (TL) normalisiert. Die Quotienten LVM/TL beziehungsweise HW/TL wurden daraufhin für die einzelnen Gruppen graphisch dargestellt. Weiterhin wurden Parameter der Herzfunktion wie die Ejektionsfraktion (EF) und die prozentuale systolische Verkürzungsfraction (FS, *engl. fractional shortening*) des linken Ventrikels mittels Ultraschall bestimmt. Die EF gibt den prozentualen Anteil des ausgeworfenen Blutes am enddiastolischen Blutvolumen des Ventrikels an. Sie ist abhängig von der Vorlast, der Nachlast und der Kontraktilität des ventrikulären Myokards.

#### 4.1.1 MH-Entwicklung nach Drucklastinduktion (4 Wochen)

Im Folgenden sind das nach Organentnahme ermittelte Herzgewicht relativ zur Tibialänge (Abbildung 4.9) und die in der Echokardiographie in Woche vier berechnete LVM im Verhältnis zur Tibialänge graphisch dargestellt (Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.9: Darstellung des relativen Herzgewichts vier Wochen nach TAC-Induktion.** HW = Herzgewicht; TL = Tibiallänge; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.10: Darstellung der relativen LVM nach vier Wochen TAC.** LVM = linksventrikuläre Masse; TL = Tibiallänge; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

In den männlichen Tieren zeigte sich nach vier Wochen TAC eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Erhöhung der LVM/TL (6,10 mg/mm) und HW/TL relativ zur Kontrollgruppe. Die HW/TL erreichte in den placebobehandelten TAC-Männchen mit 8,6 mg/mm den höchsten Wert von allen Gruppen. Die E2-Behandlung führte zur signifikanten Reduktion der HW/TL im Vergleich zur Placebobehandlung.

Die placebobehandelten Sham-Weibchen wiesen mit 5,79 mg/mm eine geringere HW/TL und mit 4,77 mg/mm geringere LVM/TL-Werte auf als die entsprechenden männlichen Tiere. Nach vier Wochen TAC waren HW/TL (7,5 mg/mm) und LVM/TL (5,95 mg/mm) signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Auch diese Werte lagen unter jenen der TAC-Männchen. Bei E2-Behandlung zeigte sich eine relativ zur Placebobehandlung signifikant niedrigere LVM/TL.

In den OVX-Tieren waren nach vier Wochen TAC HW/TL und LVM/TL signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die LVM/TL war nach TAC mit 6,39 mg/mm, die HW/TL mit 7,93 mg/mm in den OVX-Tieren stärker erhöht als in den Weibchen. Die E2-Behandlung führte im Vergleich zur Placebobehandlung zur signifikanten Reduktion von LVM/TL.

Diese Ergebnisse demonstrieren eine deutliche MH-Ausprägung innerhalb von vier Wochen nach TAC-Induktion. Die E2-Behandlung führte in den männlichen Tieren mit

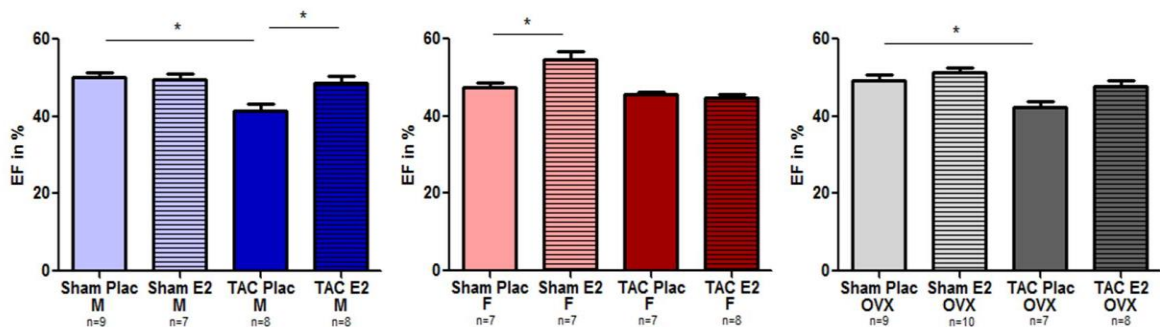
Signifikanz und in den weiblichen Tieren im Trend zur Reduktion der HW/TL. Weiterhin zeigten sich nach E2-Behandlung ein Trend zur Verminderung der LVM/TL in den männlichen Tieren, sowie eine signifikante Reduktion der LVM/TL in den weiblichen Tieren.

#### 4.1.2 E2 verhindert die TAC-induzierte EF-Reduktion in Männchen und OVX

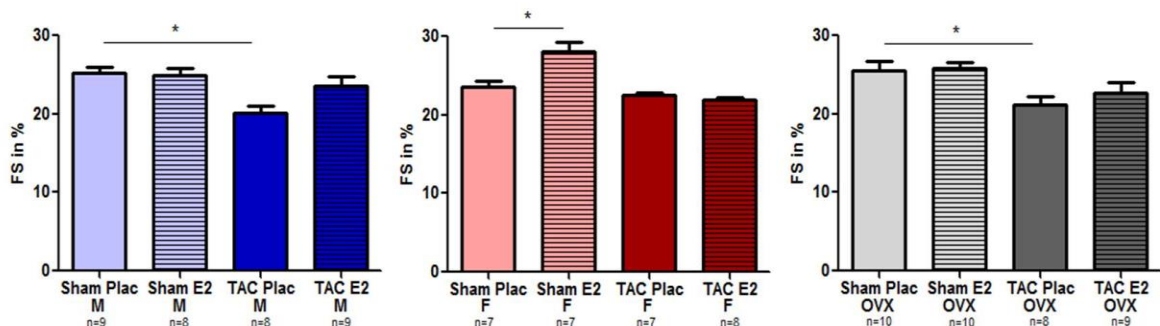
Vier Wochen nach TAC waren EF (Abbildung 4.11) und FS (Abbildung 4.12) in den Männchen signifikant ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Die E2-Behandlung führte zu einer Verbesserung der Herzfunktion durch die signifikante Erhöhung der EF im Vergleich zur Placebobehandlung. Weiterhin führte E2 im Trend zu einer höheren FS im Vergleich zur Placebobehandlung.

In den Weibchen war vier Wochen nach TAC keine Veränderung der systolischen Parameter zu verzeichnen. Jedoch führte eine E2-Behandlung zur signifikanten Erhöhung der EF- und FS-Werte in der Sham-Gruppe.

In den OVX-Tieren zeigten sich analog zu den Daten der Männchen eine signifikante Reduktion von EF und FS nach TAC relativ zur Kontrollgruppe. Bei E2-Behandlung der OVX-TAC-Tiere war im Vergleich zur Placebobehandlung eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung von EF und FS zu verzeichnen.



**Abbildung 4.11: Darstellung der Ejektionsfraktion nach vier Wochen TAC.** EF = Ejektionsfraktion; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.12: Darstellung der Verkürzungsfraktion nach vier Wochen TAC.** FS = Verkürzungsfraktion; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2

---

= östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit 0,05 an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

## 4.2 Veränderungen im Glukosemetabolismus bei Hypertrophie und E2-Effekte

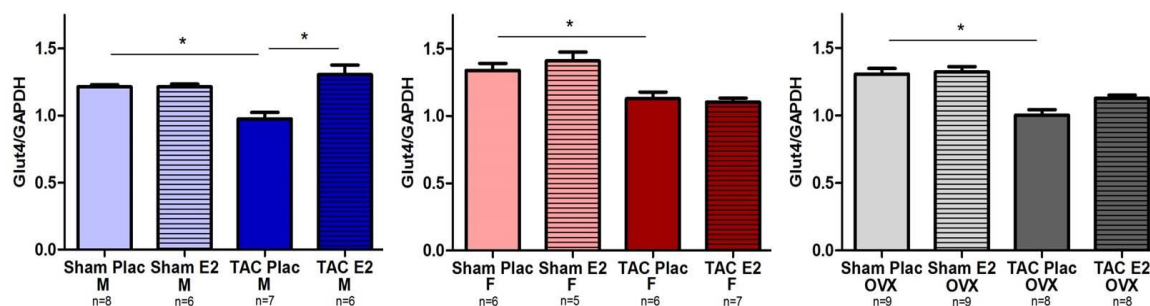
In diesem Kapitel sind die Expressionsmuster der Schlüsselenzyme des Glukosestoffwechsels dargestellt. Glukosetransporter sind essenziell für den zellulären Glukoseumsatz in ihrer Funktion Glukose in die Zelle zu importieren. Daher wurden weiterhin der insulinabhängige Glukosetransporter Typ 4 und der insulinunabhängige Glukosetransporter Typ 1 zu Expressionsanalysen herangezogen. Die Enzyme Hexokinase 2 und Phosphofruktokinase 1 katalysieren geschwindigkeitsbestimmende Reaktionen der Glykolyse und wurden ebenfalls in die Expressionsanalysen eingeschlossen.

### 4.2.1 E2 hemmt die MH-induzierte Glut-Reduktion in Männchen

Vier Wochen nach TAC war eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Senkung der Glut4-Genexpression der männlichen Tiere relativ zur Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abbildung 4.13). Die E2-Behandlung führte zu einer signifikant höheren Glut4-Expression im Vergleich zur Placebobehandlung.

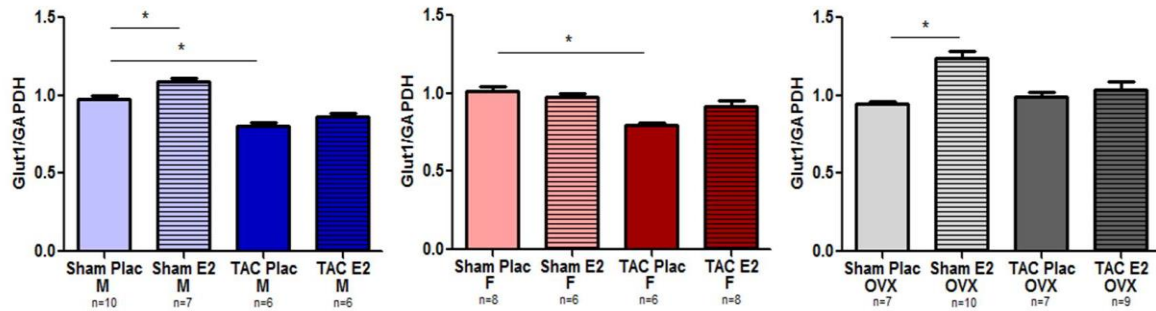
In den weiblichen Tieren wurde vier Wochen nach TAC ebenfalls eine signifikante Verminderung der Glut4-Expression relativ zur Kontrollgruppe beobachtet. Die Behandlung mit E2 zeigte hier jedoch keine Effekte.

Auch in den OVX-Tieren fand sich vier Wochen nach TAC-Induktion eine signifikante Reduktion der Glut4-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei E2-Behandlung war keine signifikante Glut4-Reduktion relativ zur Placebobehandlung zu verzeichnen.



**Abbildung 4.13: Darstellung der relativen Glut4-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit 0,05 an. M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.





**Abbildung 4.14: Darstellung der relativen Glut1-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovarektomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit 0,05 an. M = männlich; F = weiblich; OVX = ovarektomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

In den männlichen Tieren war die Glut1-Expression nach TAC-Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ( $p \leq 0,05$ ) vermindert (Abbildung 4.14). Die E2-Behandlung der TAC-Männchen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Glut1-Expression. Die E2-Behandlung der männlichen Sham-Gruppe führte zur signifikanten Steigerung der Glut1-Expression relativ zur Kontrollgruppe.

Die TAC führte in den weiblichen Tieren ebenfalls zu einer signifikanten Glut1-Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung der TAC-Weibchen führte nur im Trend zur Erhöhung der Glut1-Expression.

Die Glut1-Expression in den OVX-Tieren war im Vergleich zur Kontrollgruppe nach vier Wochen TAC nahezu unverändert. Die E2-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die OVX-TAC-Tiere. In der Sham-Gruppe führte die E2-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der Glut1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

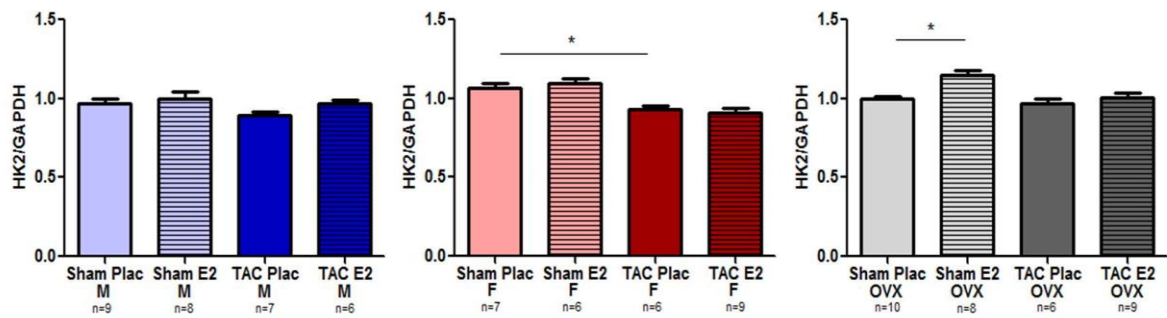
#### 4.2.2 E2 steigert die Expression der Hexokinase 2 und Phosphofruktokinase in OVX

In den männlichen Tieren zeigten sich vier Wochen nach TAC-Induktion keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von Hexokinase 2 (HK2, Abbildung 4.15) und Phosphofruktokinase (PFKm, Abbildung 4.16). Die E2-Behandlung führte nur im Trend zur Zunahme der HK2- und PFKm-Expression.

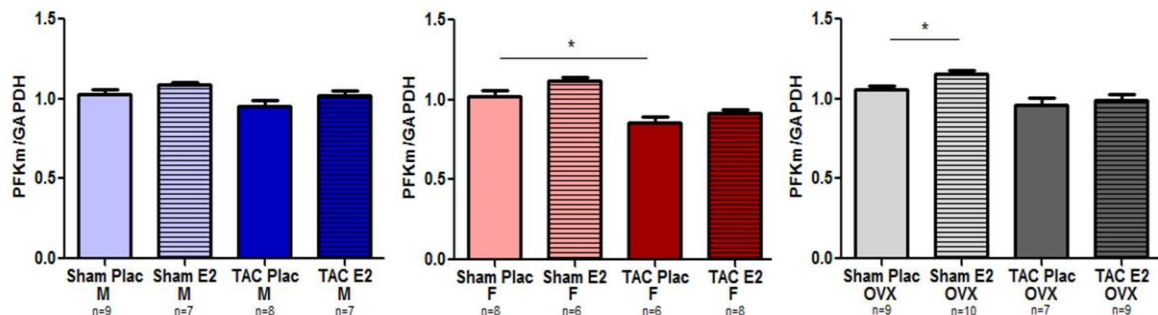
Die weiblichen Tiere wiesen vier Wochen nach TAC eine signifikant verminderte Genexpression von HK2 und PFKm im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dabei war der Effekt der E2-Behandlung auf die HK2- und PFKm-Expression im Vergleich zur Placebobehandlung vernachlässigbar.

Ähnlich wie bei den männlichen Tieren bewirkte die TAC auch in den OVX-Tieren keine signifikanten Veränderungen der HK2- und PFKm-Expression. Nach der E2-Behandlung war hier ebenfalls kein signifikanter Effekt zu beobachten. Jedoch führte die E2-

Behandlung der OVX-Sham-Tiere zur signifikanten HK2- und PFKm-Steigerung relativ zur Kontrollgruppe.



**Abbildung 4.15: Darstellung der relativen HK2-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.16: Darstellung der relativen PFKm-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 4.3 Fettsäurestoffwechsel bei MH und Einflüsse Östrogens

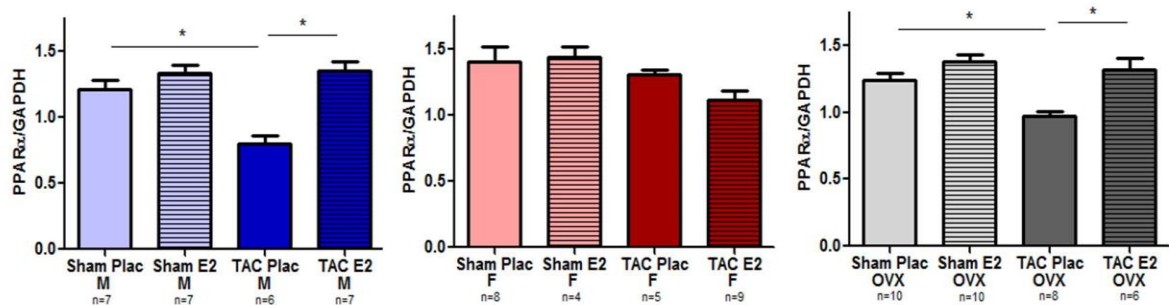
Es folgt ein Überblick über die für die einzelnen Tiergruppen durchgeführten Untersuchungen des Fettsäuremetabolismus. Es wurde die Expression wichtiger Schlüsselenzyme des Energiehaushaltes wie PPAR $\alpha$ , - $\beta/\delta$  und - $\gamma$  untersucht. Sie gelten als Regulatoren von Fettsäuretransportern wie CD36, CPT-1 und CPT-2 und fettsäuredegradierenden Enzymen wie LCAD, MCAD und ACOX-1, die ebenfalls Gegenstand von Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit waren.

#### 4.3.1 E2 erhält die PPAR $\alpha$ -Expression bei MH in Männchen und OVX

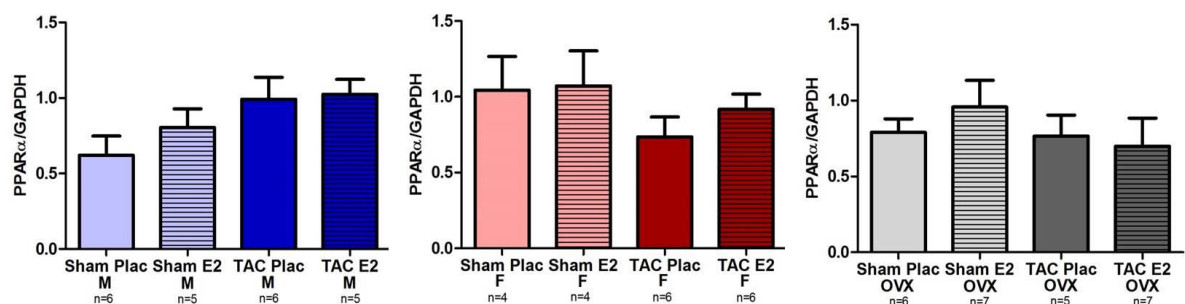
Vier Wochen nach TAC-Induktion war die relative Genexpression des PPAR $\alpha$  (Abbildung 4.17) in den männlichen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Die E2-Behandlung führte zu einer signifikanten PPAR $\alpha$ -Steigerung über das Kontrollniveau hinaus. Die PPAR $\alpha$ -Proteinexpression der männlichen Tiere (Abbildung 4.18) zeigte keine signifikanten Veränderungen.

In den weiblichen Tieren wurden nach vier Wochen TAC keine signifikanten Veränderungen der PPAR $\alpha$ -Expression auf Gen- und Proteinebene beobachtet. Auch die E2-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die PPAR $\alpha$ -Expression. In der weiblichen Kontrollgruppe war die PPAR $\alpha$ -Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollgruppen der männlichen und OVX-Tiere signifikant erhöht.

In den OVX-Tieren zeigte sich vier Wochen nach TAC analog zu den Männchen eine signifikante PPAR $\alpha$ -Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wie bei den männlichen Tieren führte die E2-Behandlung verglichen mit der Placebobehandlung zu einer signifikanten Erhöhung der PPAR $\alpha$ -Genexpression. Die Proteinexpression zeigte auch in den OVX-Tieren keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.17: Darstellung der relativen PPAR $\alpha$ -Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.18: Darstellung der relativen PPAR $\alpha$ -Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

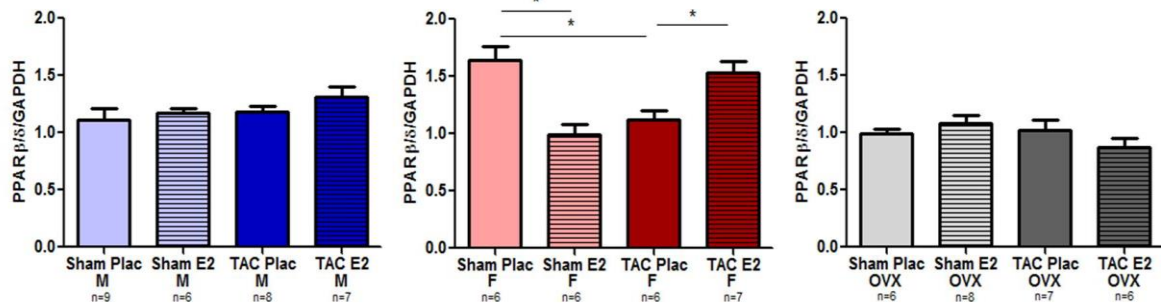
#### 4.3.2 E2 erhält die PPAR $\beta/\delta$ -Expression bei MH in Weibchen

Nach vier Wochen MH-Entwicklung waren in den männlichen Tieren keine signifikanten Veränderungen der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression zu verzeichnen. Die E2-Behandlung führte nur im Trend zur Erhöhung der PPAR $\beta/\delta$ -Expression (Abbildung 4.19).

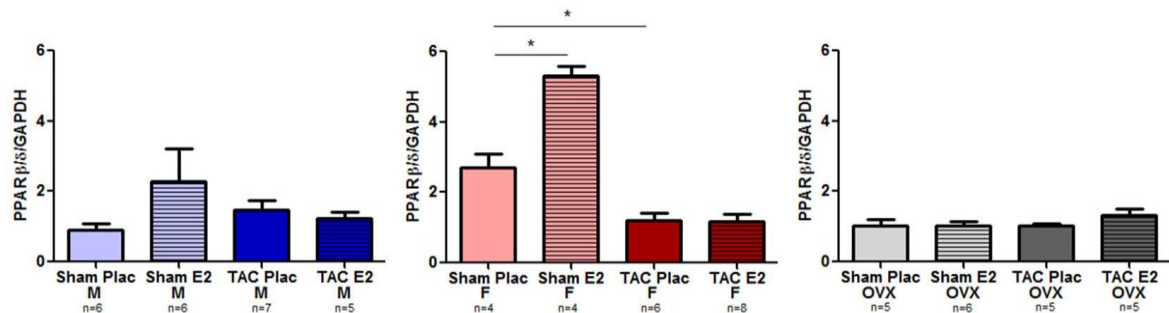
In den weiblichen Tieren zeigte sich vier Wochen nach TAC eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzierte PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression. Die E2-Behandlung führte zu einem signifikanten PPAR $\beta/\delta$ -Anstieg, der nur knapp unter dem Kontrollniveau lag. Die weiblichen Sham-Tiere zeigten nach E2-Behandlung eine stark reduzierte PPAR $\beta/\delta$ -

Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin war PPAR $\beta/\delta$  in der weiblichen Kontrollgruppe relativ zu den Kontrollgruppen der Männchen und OVX-Tieren signifikant höher exprimiert.

Wie bei den männlichen Tieren waren auch in den OVX-Tieren keine signifikanten Veränderungen der PPAR $\beta/\delta$ -Expression zu beobachten. Die E2-Behandlung der OVX-Tiere hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die PPAR $\beta/\delta$ -Expression.



**Abbildung 4.19: Darstellung der relativen PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.20: Darstellung der relativen PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

In den männlichen Tieren waren nach vier Wochen TAC keine signifikanten Veränderungen der PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression zu verzeichnen. Auch die E2-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die Proteinexpression (Abbildung 4.20).

Die weiblichen Tiere zeigten nach TAC eine signifikante Reduktion der PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte hier nicht zum signifikanten PPAR $\beta/\delta$ -Anstieg. In den Sham-Weibchen führte die E2-Behandlung nahezu zur Verdopplung der PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression. Der Vergleich der drei Kontrollgruppen untereinander ergab eine erhöhte PPAR- $\beta/\delta$ -Proteinexpression der weiblichen Tiere relativ zu den Kontrollgruppen der Männchen und OVX-Tiere.

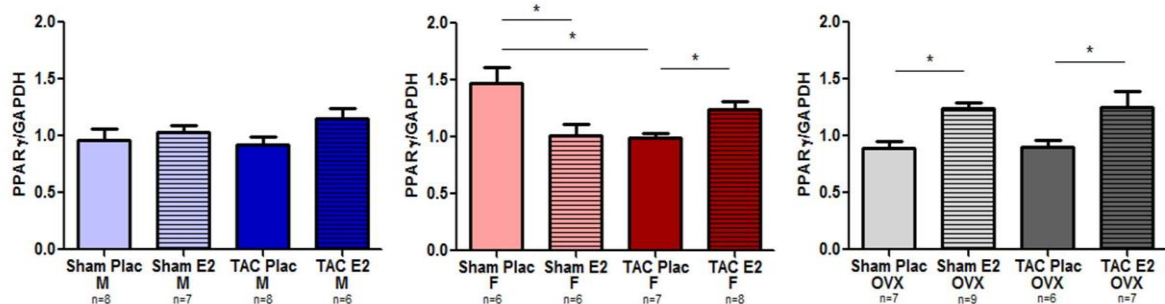
Auch in den OVX-Tieren waren keine signifikanten Veränderungen der PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression zu beobachten. Die E2-Behandlung der OVX-Tiere hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression.

### 4.3.3 E2 erhält die PPAR $\gamma$ -Expression bei MH in Weibchen

Nach vier Wochen TAC-Induktion waren in den männlichen Tieren keine signifikanten Veränderungen der PPAR $\gamma$ -Genexpression zu beobachten. Die E2-Behandlung führte nur im Trend zur Erhöhung der PPAR $\gamma$ -Genexpression (Abbildung 4.21).

Die weiblichen Tiere zeigten nach TAC eine signifikante Reduktion der PPAR $\gamma$ -Expression relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung der TAC-Weibchen führte zu einem signifikanten PPAR $\gamma$ -Anstieg. Die weiblichen Sham-Tiere zeigten nach E2-Behandlung eine stark reduzierte PPAR $\gamma$ -Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin war PPAR $\gamma$  in der weiblichen Kontrollgruppe relativ zu den Kontrollgruppen der Männchen und OVX-Tieren signifikant höher exprimiert.

In den OVX-Tieren zeigte sich die PPAR $\gamma$ -Expression nach vier Wochen MH-Entwicklung nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte zu einer signifikanten PPAR $\gamma$ -Erhöhung relativ zur Placebobehandlung. Auch in den OVX-Sham-Tieren führte die E2-Behandlung zur signifikanten Steigerung der PPAR $\gamma$ -Expression.



**Abbildung 4.21: Darstellung der relativen PPAR $\gamma$ -Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 4.3.4 GU und E2-Einflüsse im Fettsäuretransport bei MH

Die Voraussetzung für eine reguläre FAO ist der Transport von Fettsäuren (FA) in die mitochondriale Matrix. Der plasmamembranständige Transporter CD36 importiert FA in das Zytosol der Zelle. Der Weg der FA vom Zytoplasma in die mitochondriale Matrix wird von den Carnitin-Palmitoyltransferasen 1 und 2 kontrolliert. Im Folgenden werden die Expressionsmuster der beiden Schlüsselenzyme beschrieben.

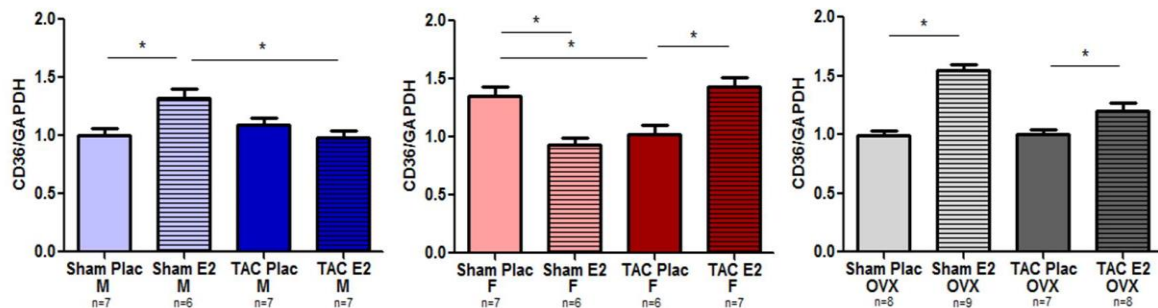
#### 4.3.4.1 E2 erhält die CD36-Expression bei MH in Weibchen

In den männlichen Tieren waren nach vier Wochen TAC-Induktion keine signifikanten Veränderungen der CD36-Genexpression zu beobachten. Die E2-Behandlung zeigte hier keinen Einfluss auf die CD36-Expression (Abbildung 4.22). Die E2-Behandlung der Sham-Tiere führte zu einer signifikanten CD36-Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Die weiblichen Tiere zeigten nach vier Wochen TAC eine signifikante Reduktion der CD36-Expression relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung der TAC-Weibchen führte zu einem signifikanten CD36-Anstieg über das Kontrollniveau hinaus. In den weiblichen Sham-Tieren führte die E2-Behandlung zu einer stark reduzierten CD36-Expression relativ zur Kontrollgruppe. In der weiblichen Kontrollgruppe war CD36 im Vergleich zu den Kontrollgruppen der Männchen und OVX-Tieren signifikant höher exprimiert.

In den OVX-Tieren war die CD36-Expression nach vier Wochen MH-Entwicklung nahezu unverändert verglichen mit der Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte zu einer signifikanten CD36-Erhöhung relativ zur Placebobehandlung. Ebenso führte die E2-Behandlung in den OVX-Sham-Tieren zur signifikanten Zunahme der CD36-Expression.



**Abbildung 4.22: Darstellung der relativen CD36-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

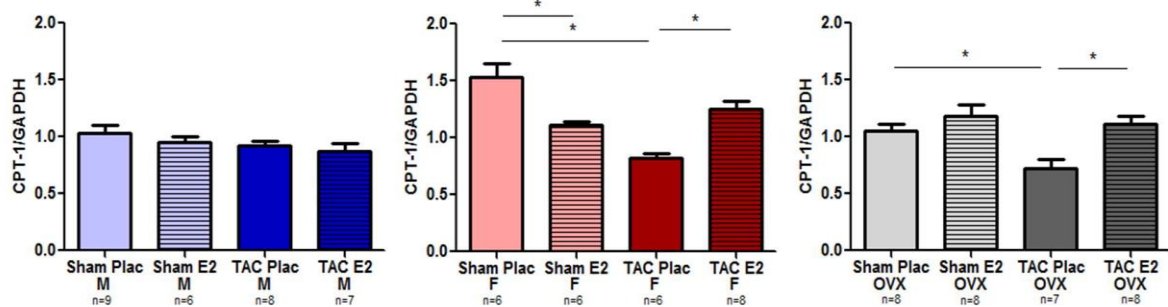
#### 4.3.4.2 E2 erhält die CPT-Expression bei MH in Weibchen und OVX

Nach 4 Wochen MH-Entwicklung zeigte sich die CPT-1-Expression (Abbildung 4.23) in den männlichen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu unverändert. Die CPT-2-Expression (Abbildung 4.24) war signifikant vermindert. Die E2-Behandlung hatte hier keinen signifikanten Effekt.

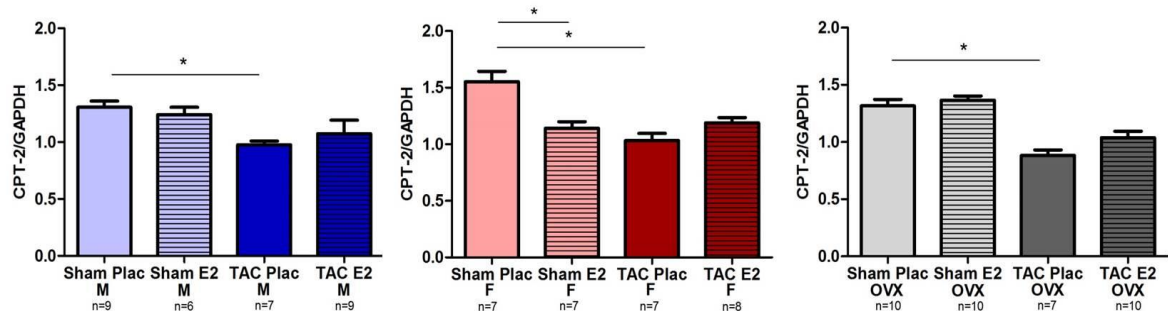
Die weiblichen Tiere zeigten nach TAC eine signifikante Reduktion der CPT-1- und CPT-2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung der TAC-Weibchen führte in beiden Fällen zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression auf Werte unterhalb des Normalniveaus. Die weiblichen Sham-Tiere zeigten nach E2-Behandlung eine stark reduzierte Expression von CPT-1 und CPT-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin waren sowohl CPT-1 als auch CPT-2 in der weiblichen Kontrollgruppe relativ zu den Kontrollgruppen der Männchen und OVX-Tieren signifikant höher exprimiert.

In den OVX-Tieren zeigte sich eine signifikante Verminderung der CPT-1- und CPT-2-Genexpression nach TAC-Induktion verglichen mit der Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte im Vergleich zur Placebobehandlung zur signifikanten Steigerung der

CPT-1-Expression über das Kontrollniveau hinaus. Dagegen war die CPT-2-Expression nur im Trend erhöht.



**Abbildung 4.23: Darstellung der relativen CPT-1-Genexpression.** CPT = Carnitin-Palmitoyltransferase; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomized; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.24: Darstellung der relativen CPT-2-Genexpression.** CPT = Carnitin-Palmitoyltransferase; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomized; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.3.5 E2 erhält die MCAD- und LCAD-Expression bei MH

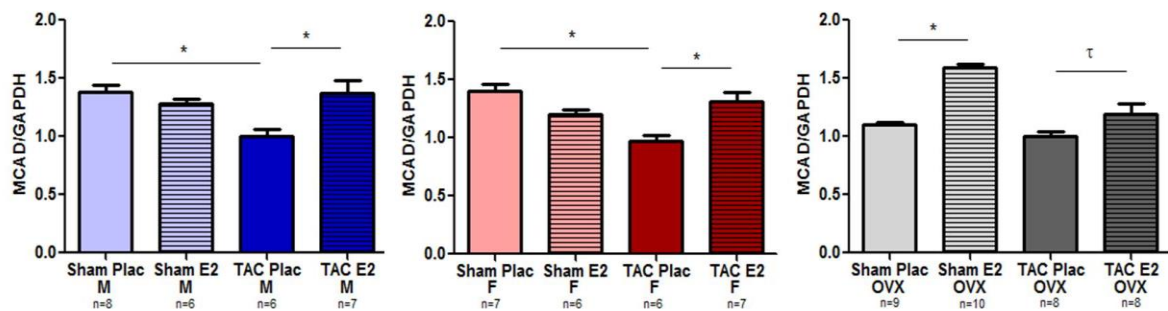
Nach dem Transport der Fettsäuren in die mitochondriale Matrix werden diese durch verschiedene Dehydrogenasen weiter metabolisiert. Diese Dehydrogenasen lassen sich anhand der Kettenlänge ihrer Substrate unterteilen. Im Folgenden werden die Expressionsmuster der Mittel- und Langketten-Acyl-CoA-Dehydrogenasen MCAD (Abbildung 4.25) und LCAD (Abbildung 4.26) dargestellt.

In den männlichen Tieren war nach MH-Entwicklung eine signifikante Senkung der MCAD- und LCAD-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Die E2-Behandlung erhöhte die Expression von MCAD und LCAD wieder auf Normalniveau.

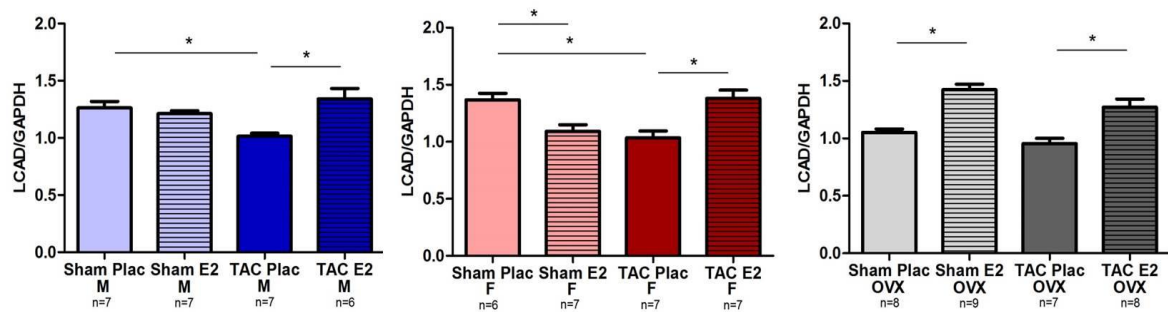
Die weiblichen Tiere zeigten nach vier Wochen TAC eine signifikante Verminderung der MCAD- und LCAD-Expression relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung der TAC-Weibchen führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression auf Kontrollniveau. Die weiblichen Sham-Tiere zeigten nach E2-Behandlung eine signifikant

reduzierte Expression von LCAD und eine im Trend sinkende MCAD-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In den OVX-Tieren waren die MCAD- und die LCAD-Expression nach TAC-Induktion nahezu unverändert verglichen mit der Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte zu einer signifikanten LCAD-Erhöhung und zu einer im Trend steigenden MCAD-Expression relativ zur Placebobehandlung. Ebenso führte die E2-Behandlung in den OVX-Sham-Tieren zur Zunahme der LCAD- und MCAD-Expression.



**Abbildung 4.25: Darstellung der relativen MCAD-Genexpression.** MCAD = Medium Chain Acyl Dehydrogenase; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an, † gibt den P-Wert mit  $\leq 0,07$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.26: Darstellung der relativen LCAD-Genexpression.** LCAD = Long Chain Acyl Dehydrogenase; M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

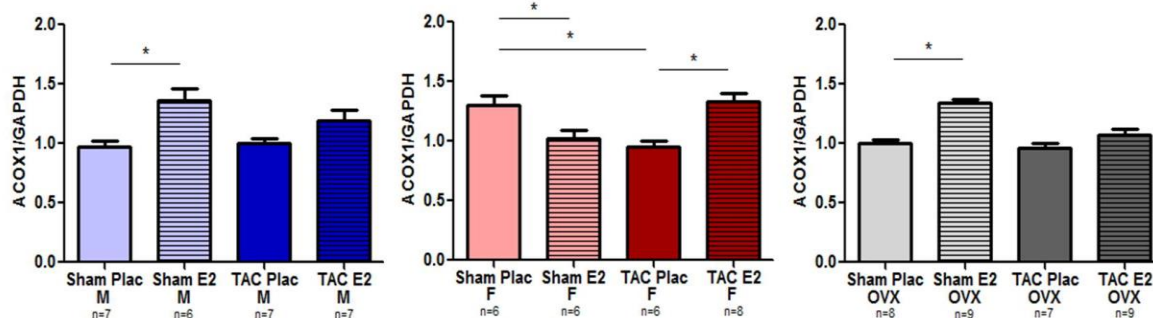
#### 4.3.6 E2 erhält die ACOX-Expression bei MH in Weibchen

In den männlichen Tieren waren nach vier Wochen MH-Entwicklung keine signifikanten Veränderungen der ACOX-1-Genexpression relativ zur Kontrollgruppe zu beobachten (Abbildung 4.27). Die E2-Behandlung führte hier nur im Trend zur Steigerung der ACOX-1-Expression. Die E2-Behandlung der Sham-Tiere führte zu einer signifikanten ACOX-1-Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die weiblichen Tiere zeigten nach TAC eine signifikante ACOX-1-Senkung relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung der TAC-Weibchen erhöhte die ACOX-1-Expression in etwa auf Kontrollniveau. In den weiblichen Sham-Tieren führte die E2-Behandlung zu einer stark reduzierten ACOX-1-Expression relativ zur Kontrollgruppe.



In den OVX-Tieren wurde nach vier Wochen MH-Entwicklung eine unveränderte ACOX-1-Expression relativ zur Kontrollgruppe beobachtet. Die E2-Behandlung hatte hier keinen signifikanten Effekt auf die ACOX-1-Expression. Analog zu den Männchen führte die E2-Behandlung in den OVX-Sham-Tieren zur signifikanten Zunahme der ACOX-1-Expression.



**Abbildung 4.27: Darstellung der relativen ACOX-1-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.4 GU in der Expression metabolischer Regulatoren bei MH

Die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpressionsanalyse der Stoffwechselregulatoren PGC-1 $\alpha$ , NRF-1 und Tfam werden in diesem Kapitel beschrieben. PGC-1 $\alpha$  ist als PPAR-Ko-Aktivator an der Regulation der zuvor präsentierten Enzyme des Fettsäuremetabolismus beteiligt. Darüber hinaus beeinflusst dieser Ko-Regulator die Transkription von NRF-1, welcher die Synthese zahlreicher nukleär kodierter Untereinheiten der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette stimuliert und ferner die Tfam-Transkription induziert. Tfam ist für die Transkription mitochondrial kodierter Untereinheiten der Elektronentransportkette verantwortlich.

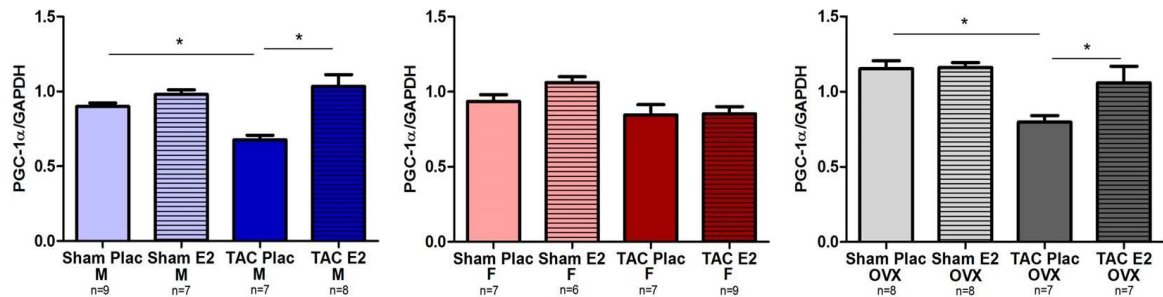
##### 4.4.1 E2 erhält die PGC-1 $\alpha$ -Expression in Männchen und OVX

Die PGC-1 $\alpha$ -Gen- (Abbildung 4.28) und Proteinexpression (Abbildung 4.29) waren in den männlichen Tieren nach vierwöchiger TAC signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte zum signifikanten Anstieg der PGC-1 $\alpha$ -Expression auf Werte oberhalb des Kontrollniveaus.

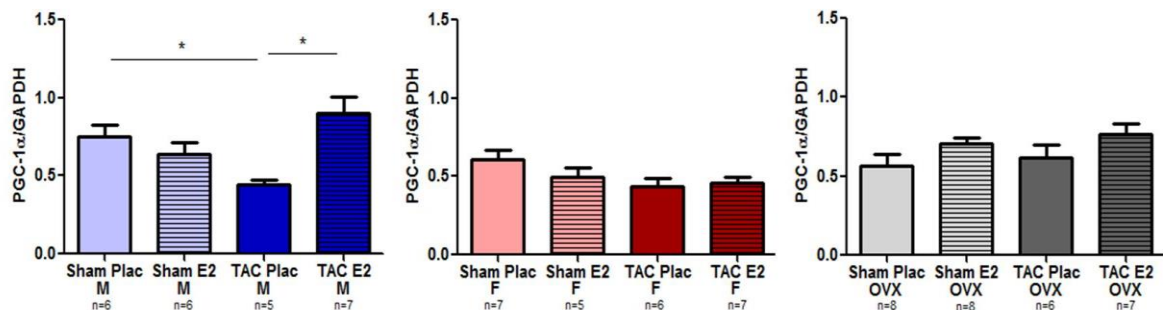
In den weiblichen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede in der PGC-1 $\alpha$ -Gen- und Proteinexpression zu verzeichnen.

Wie auch in den männlichen Gruppen konnte in den OVX-Tieren eine signifikante Senkung der PGC-1 $\alpha$ -Genexpression nach TAC beobachtet werden. E2-Behandlung führte nach 4 Wochen MH-Entwicklung zur signifikanten PGC-1-Erhöhung relativ zur

Placebobehandlung. Die PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression zeigte in den OVX-Gruppen keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 4.28: Darstellung der relativen PGC-1 $\alpha$ -Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovarektomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

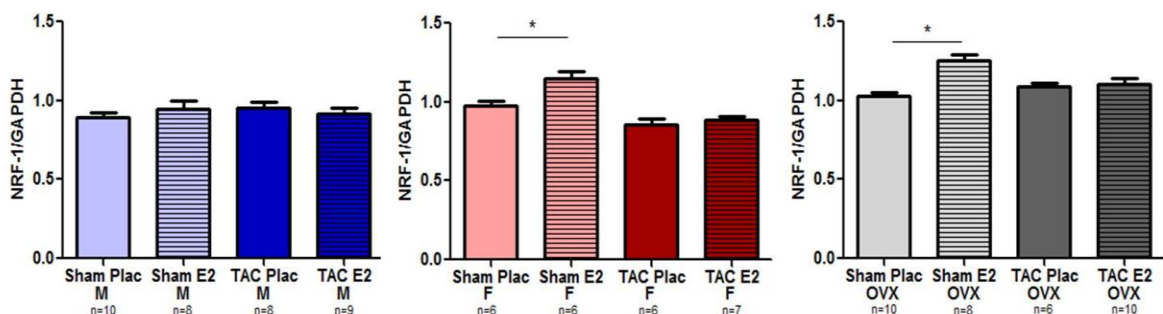


**Abbildung 4.29: Darstellung der relativen PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovarektomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

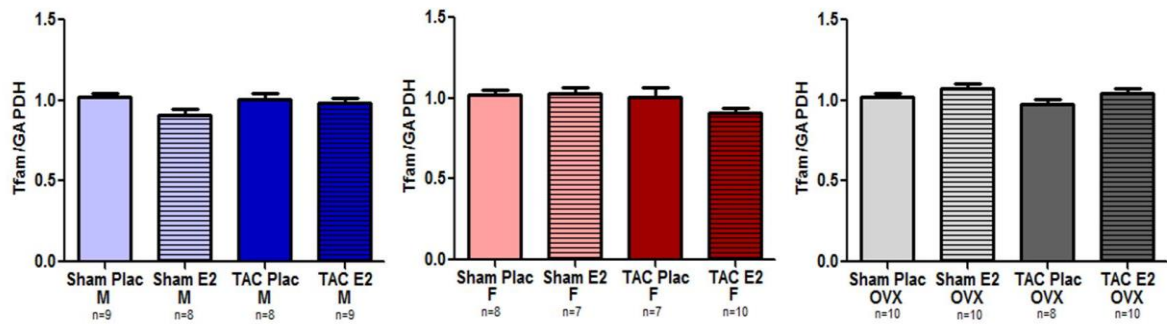
#### 4.4.2 E2-Behandlung steigert die NRF-1-Expression in Weibchen

Die NRF-1-Genexpression (Abbildung 4.30) zeigte in den männlichen Gruppen keine Unterschiede.

In den weiblichen Sham-Tieren mit und ohne Ovarektomie konnte ein signifikanter Anstieg der NRF-1-Expression nach E2-Behandlung beobachtet werden. Dieser Effekt konnte nicht in den TAC-Gruppen beobachtet werden.



**Abbildung 4.30: Darstellung der relativen NRF-1-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovarektomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.31: Darstellung der relativen Tfam-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

In der Analyse der Tfam-Genexpression (Abbildung 4.31) waren keine signifikanten Unterschiede in den männlichen, weiblichen und OVX-Gruppen zu verzeichnen.

#### 4.5 GU in der Expression nukleär kodierter ETK-Komponenten bei MH

Es folgt ein Überblick über die Resultate der Gen- und Proteinexpressionsanalysen von Komponenten der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette, in welcher die katabolen Stoffwechselprozesse schließlich zur ATP-Generierung konvergieren.

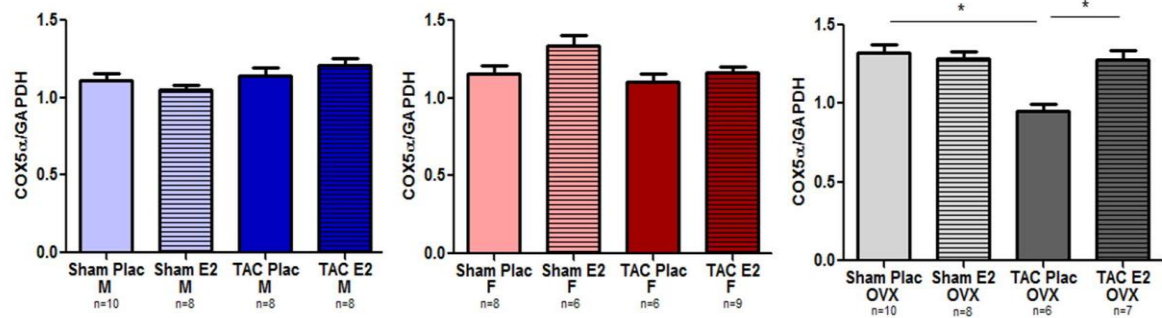
Es wurden verschiedene nukleär kodierte Untereinheiten der einzelnen Komplexe der ETK untersucht. Der Subkomplex 8 der NADH Dehydrogenase 1 $\beta$  (NDUFB8) repräsentierte dabei Komplex I der ETK. Weiterhin wurde die Untereinheit B der Succinat-Dehydrogenase (SDHB), die einen Teil des Komplexes II darstellt, analysiert. Das Core-Protein 2 der Ubichinon-Cytochrom-c-Reduktase (UQCRC2) wurde als Bestandteil des ETK-Komplexes III in die Untersuchung eingeschlossen. Komplex IV wurde in diesem Kapitel durch die Untereinheiten 5 $\alpha$  und 7A2 der Cytochrom-c-Oxidase (COX5 $\alpha$  und COX7A2) repräsentiert. Komplex V wurde durch Analyse der Expression der Untereinheiten alpha 1 (ATP5A) und E (ATP5k) des F0/F1-Komplexes untersucht.

##### 4.5.1 Gen- und Proteinexpression von ETK-Komponenten und E2-Einflüsse

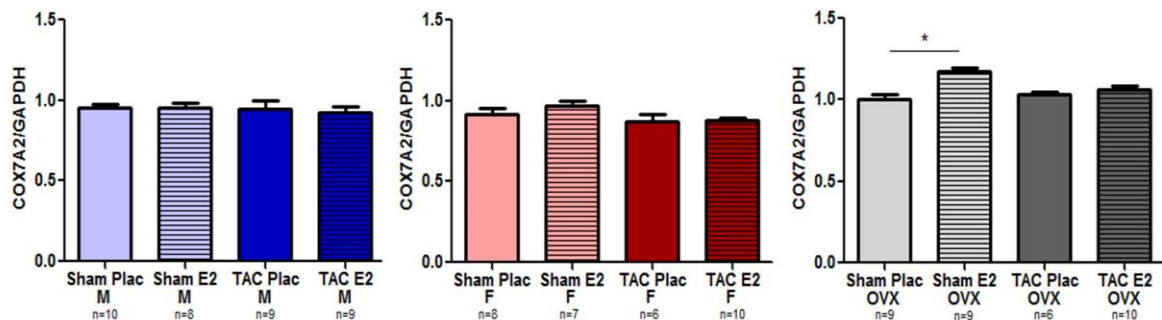
###### 4.5.1.1 E2 erhält die COX5 $\alpha$ -Expression bei MH in OVX

Bei der Untersuchung der COX5 $\alpha$ -Genexpression in den männlichen und weiblichen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 4.32).

In den OVX-Tieren wurde eine signifikante COX5 $\alpha$ -Reduktion nach 4 Wochen TAC relativ zur Kontrollgruppe beobachtet. Durch die E2-Behandlung der OVX-TAC-Tiere konnte die COX5 $\alpha$ -Expression im Vergleich zur Placebobehandlung annähernd auf Kontrollniveau erhöht werden.



**Abbildung 4.32: Darstellung der relativen COX5α-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



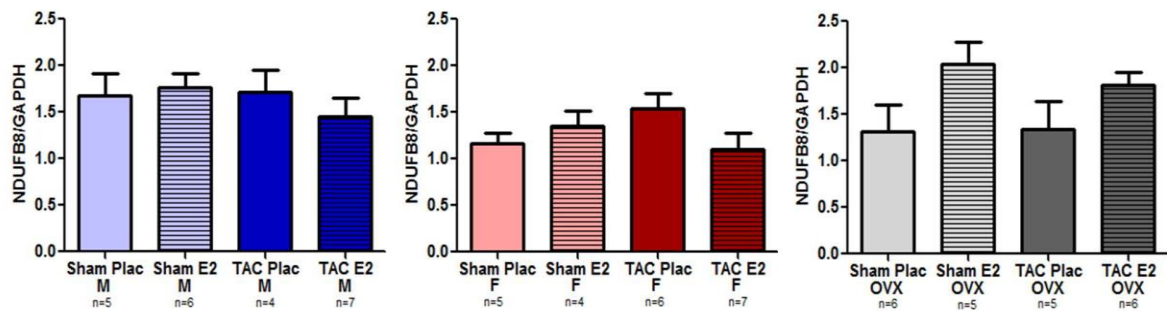
**Abbildung 4.33: Darstellung der relativen COX7A2-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Die Genexpression der Komplex-IV-Untereinheit COX7A2 zeigte keine signifikanten Veränderungen in den männlichen und weiblichen Gruppen (Abbildung 4.33).

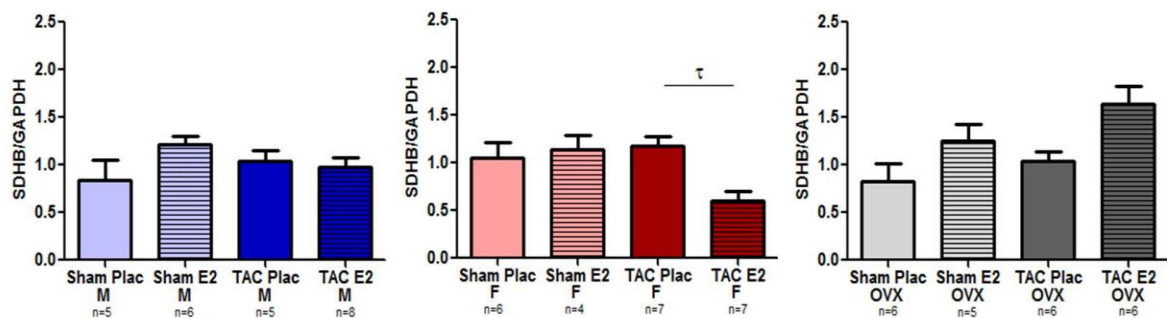
Auch in den OVX-Weibchen hatte die vierwöchige TAC keine signifikanten Effekte. In den E2-behandelten OVX-Sham-Tieren zeigte sich eine signifikant erhöhte COX7A2-Expression relativ zur Kontrollgruppe

Die Untereinheiten der Komplexe I bis II zeigten keine signifikanten Veränderungen der Quantitäten der entsprechenden Proteine. Dies betrifft den Subkomplex 8 der NADH Dehydrogenase 1 $\beta$  (NDUFB8, Komplex I, Abbildung 4.34), die Untereinheit B der Succinat-Dehydrogenase (SDHB, Komplex II, Abbildung 4.35). In den TAC-Weibchen mit E2-Behandlung war die SDHB-Proteinexpression im Vergleich zur Placebobehandlung vermindert.

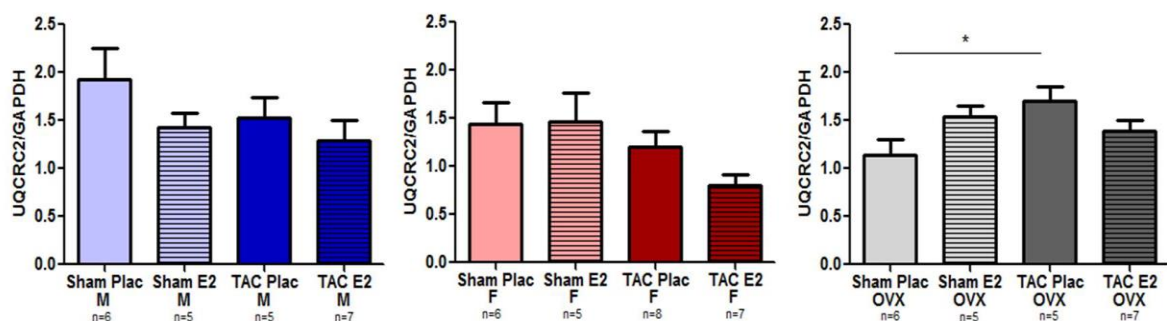
Die Komplex-III-Untereinheit UQCRC2 war in den Placebo-behandelten OVX-TAC-Tieren signifikant zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 4.36).



**Abbildung 4.34: Darstellung der relativen NDUFB8-Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.35: Darstellung der relativen SDHB-Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$ , † gibt den P-Wert mit  $\leq 0,07$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.36: Darstellung der relativen UQCRC2-Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$ , † gibt den P-Wert mit  $\leq 0,07$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

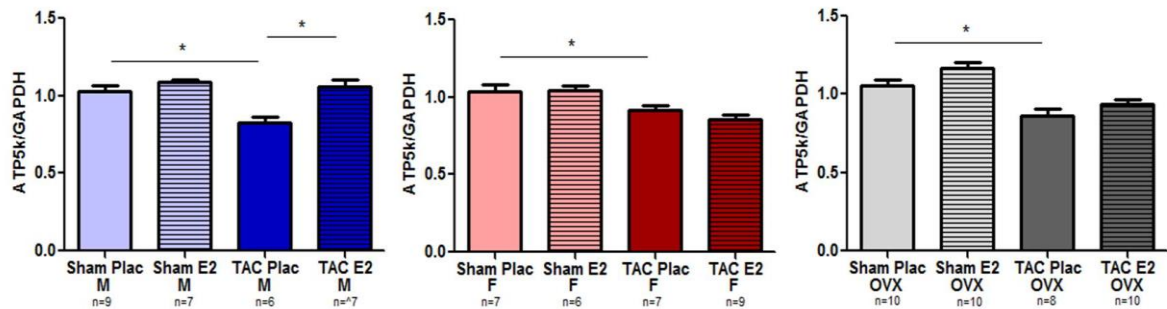
#### 4.5.1.2 E2 erhält die ATP5k-Expression bei MH in Männchen

In den männlichen Tieren war die ATP5k-Genexpression nach TAC-Induktion signifikant vermindert (Abbildung 4.37). Die E2-Behandlung führte zu einer Steigerung der ATP5k-Expression auf Kontrollniveau.

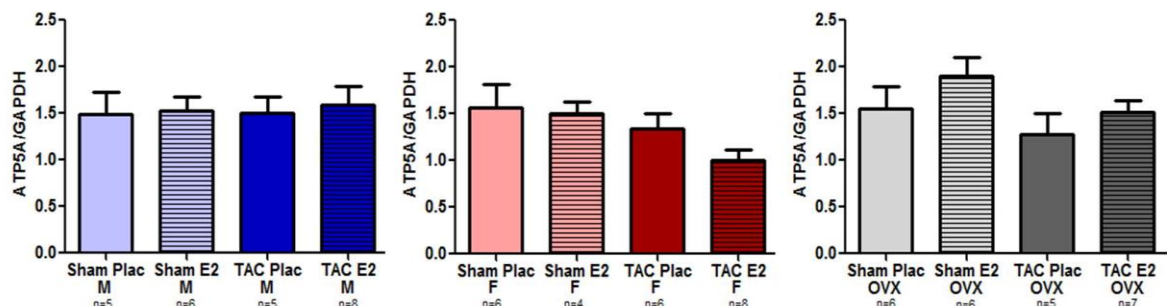
In den Weibchen zeigte sich nach 4 Wochen TAC eine signifikante Reduktion der ATP5k-Expression gegenüber der Kontrollgruppe.



In den OVX Tieren konnte ebenfalls eine signifikante Verminderung der ATP5k-Genexpression beobachtet werden. Die E2-Behandlung zeigte in den weiblichen Gruppen keine signifikante Veränderung auf die ATP5K-Expression.



**Abbildung 4.37: Darstellung der relativen ATP5k-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.38: Darstellung der relativen ATP5A-Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Die Analyse der Proteinexpression der Untereinheit Alpha 1 auch (ATP5A) des F1-Komplexes des ETK-Komplexes V ergab keine signifikanten Änderungen der ATP5A-Expression (siehe Abbildung 4.38).

#### 4.6 GU in der Expression mitochondrial kodierter ETK-Untereinheiten bei MH

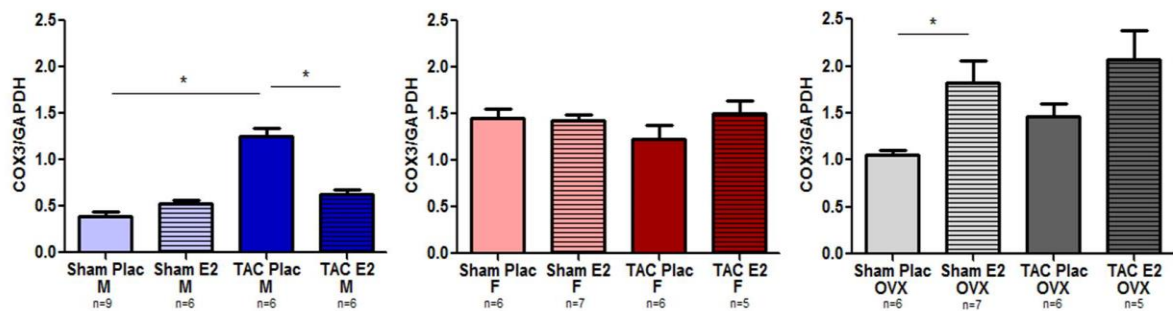
Einige wenige Untereinheiten der Komplexe der Elektronentransportkette (ETK) sind in der mitochondrialen DNA verschlüsselt und spielen eine besondere Rolle für die Integrität der Atmungskettenkomplexe. Dazu zählen auch ND1, die Untereinheit 1 der NADH-Dehydrogenase (Komplex I), sowie COX3 und COX1, die Untereinheiten 3 und 1 der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV), welche in diesem Kapitel vorgestellt werden. Die Expression dieser Gene wird unter anderem durch den mitochondrialen Transkriptionsfaktor Tfam kontrolliert.

#### 4.6.1 TAC-induzierte COX3- und ND1-Steigerung in Männchen

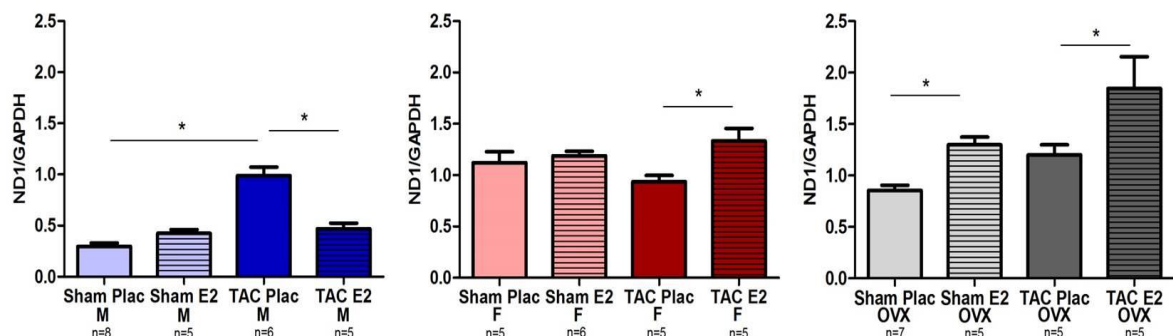
In den männlichen Tieren war nach vier Wochen TAC eine signifikante Steigerung der COX3- (Abbildung 4.39) und ND1-Genexpression (Abbildung 4.40) auf etwa das Dreifache des Kontrollwertes zu verzeichnen. Eine E2-Behandlung führte zur Reduktion der Expression beider Gene im Vergleich zur Placebobehandlung. Weiterhin wurden signifikant niedrigere Werte in der ND1- und COX3-Expression der männlichen Kontrollgruppe relativ zu den Kontrollgruppen der Weibchen und OVX beobachtet.

Nach vier Wochen MH-Entwicklung wurden in den weiblichen Gruppen im Trend reduzierte Expressionen von ND1 und COX3 beobachtet. Die E2-Behandlung erhöhte die COX3-Expression im Trend und führte zum signifikanten ND1-Anstieg.

In den OVX-Tieren war die Expression beider Gene nach vier Wochen MH-Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe im Trend erhöht. Die E2-Behandlung führte zu einer signifikanten ND1-Erhöhung und im Trend zur COX3-Steigerung relativ zur Placebobehandlung. In den OVX-Sham-Tieren erhöhte die E2-Behandlung die Expression beider Gene signifikant.



**Abbildung 4.39: Darstellung der relativen COX3-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

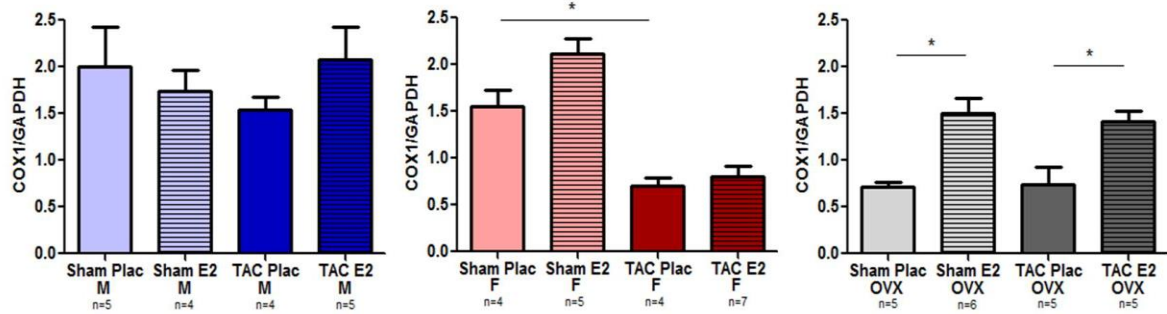


**Abbildung 4.40: Darstellung der relativen ND1-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Bei der Analyse der Proteinexpression der mitochondrial kodierten Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase (COX1, Abbildung 4.41) waren in den männlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

In den Weibchen zeigte sich 4 Wochen nach TAC-Induktion eine signifikante COX1-Minderung relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung hatte hier keinen Effekt relativ zur Placebobehandlung.

In den OVX-Tieren war COX1 nach TAC verglichen mit der Kontrollgruppe unverändert exprimiert. Die E2-Behandlung führte sowohl in den Sham-Tieren als auch in den TAC-Tieren zur COX1-Steigerung auf etwa das Doppelte des Kontrollniveaus.



**Abbildung 4.41: Darstellung der relativen COX1-Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.7 GU in der Expression antioxidativer Enzyme bei MH

Antioxidative Enzyme schützen die Zelle und ihre Organellen vor den schädigenden Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Zu diesen Enzymen gehören Uncoupling-Proteine wie UCP3, die zur Reduktion der ROS-Produktion an der ETK dienen. Enzyme wie SOD2 oder ALDH2 dienen der ROS-Detoxifizierung. Sie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung eines intakten Energiestoffwechsels und einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse beteiligt.

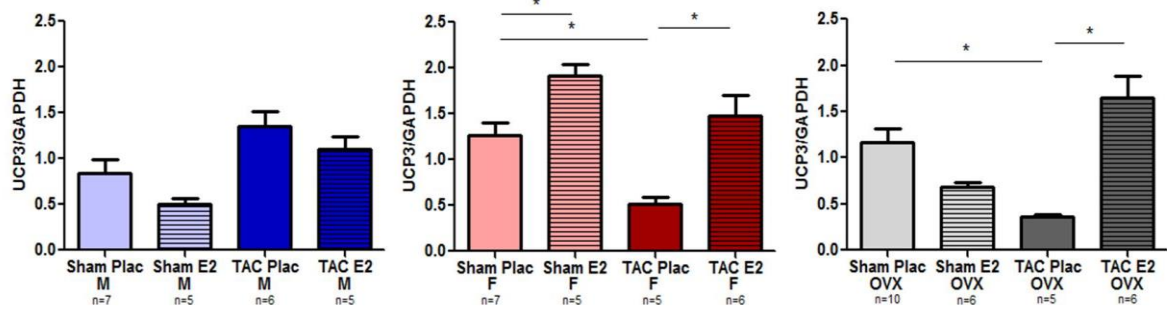
##### 4.7.1 E2 erhält die UCP3-Expression bei MH in Männchen und OVX

Nach vier Wochen MH-Entwicklung war in den männlichen Tieren ein Trend zur Erhöhung der UCP3-Genexpression zu beobachten. Die E2-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die UCP3-Expression (Abbildung 4.42).

Die weiblichen Tiere zeigten nach TAC eine signifikante Reduktion der UCP3-Expression relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung der TAC-Weibchen führte im Vergleich zur Placebobehandlung zur Erhöhung der UCP3-Expression über das Kontrollniveau hinaus. In der weiblichen Sham-Gruppe erhöhte die E2-Behandlung die UCP3-Expression signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

In den OVX-Tieren zeigte sich nach TAC eine signifikante Reduktion der UCP3-Expression relativ zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte hier zum UCP3-Anstieg auf etwa das Vierfache im Vergleich zur Placebobehandlung.





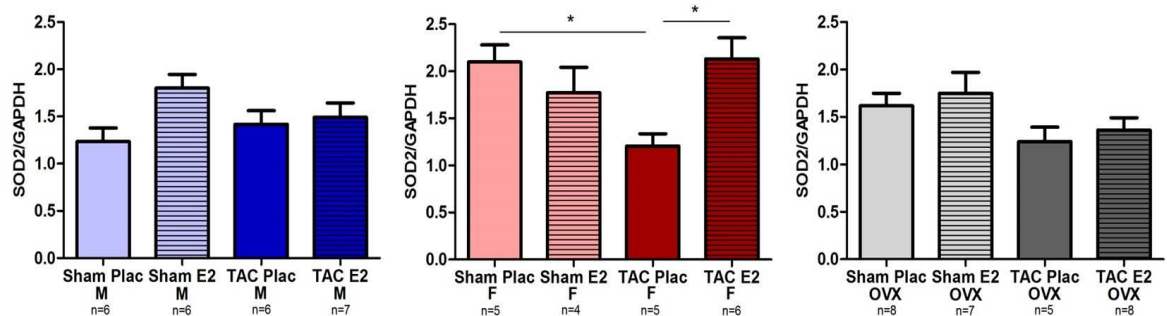
**Abbildung 4.42: Darstellung der relativen UCP3-Genexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.7.2 E2 erhält die SOD2-Expression bei MH in Weibchen

Im Gruppenvergleich der Männchen waren vier Wochen nach TAC-Induktion keine signifikanten Unterschiede in der SOD2-Proteinexpression zu verzeichnen (Abbildung 4.43). Die E2-Behandlung der männlichen Sham-Tiere führte im Trend zu einer erhöhten SOD2-Expression relativ zur Kontrolle.

In den weiblichen Tieren wurde vier Wochen nach TAC-Induktion eine signifikante SOD2-Verminderung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Die E2-Behandlung führte zur signifikanten Erhöhung der SOD2-Expression im Vergleich zur Placebo-Behandlung. Es war eine deutlich höhere SOD2-Basalexpression in der Kontrollgruppe der Weibchen verglichen mit den Männchen zu verzeichnen.

Die OVX-Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede in der SOD2-Proteinexpression auf.



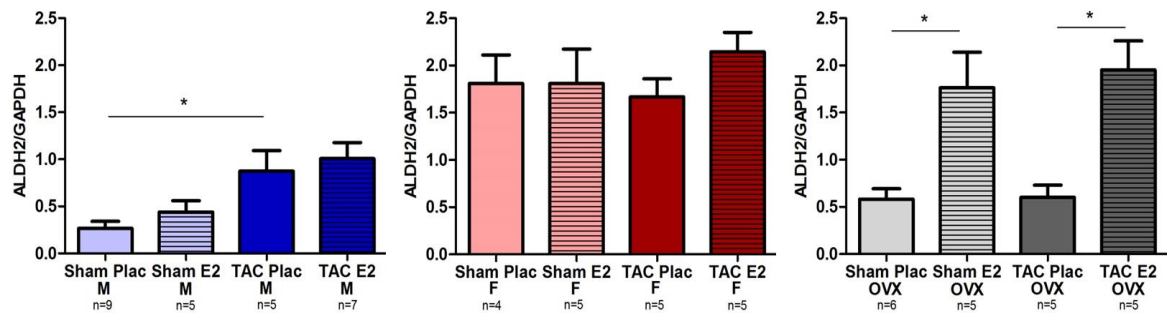
**Abbildung 4.43: Darstellung der relativen SOD2-Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.7.3 GU in der ALDH2-Expression

In den männlichen Tieren zeigte sich nach vier Wochen MH-Entwicklung eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression der Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH2) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die ALDH2-Expression (Abbildung 4.44).

In den Weibchen ohne OVX waren keine signifikanten Unterschiede in der ALDH2-Expression zu verzeichnen. Die ALDH2-Expression in der weiblichen Kontrollgruppe war relativ zur Kontrollgruppe der Männchen und OVX etwa sechsfach erhöht.

In den OVX-Tieren hatte die TAC-Induktion keine signifikanten Effekte auf die ALDH2-Expression. Die E2-Behandlung führte zur signifikanten ALDH2-Steigerung in den Sham- und TAC-Tieren.

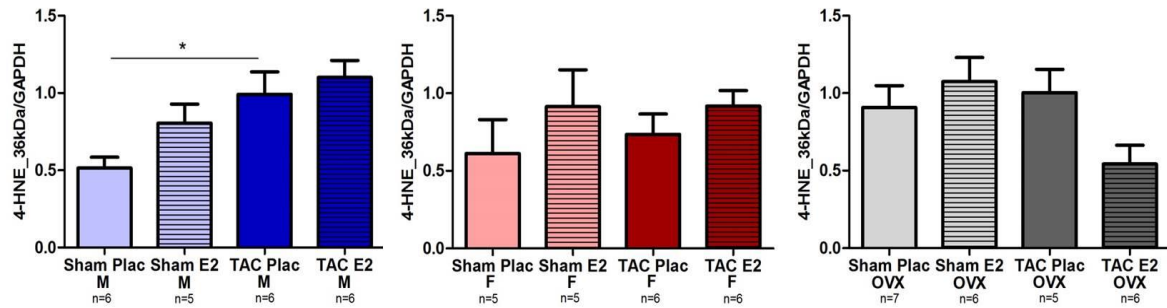


**Abbildung 4.44: Darstellung der relativen ALDH2-Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$ . Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

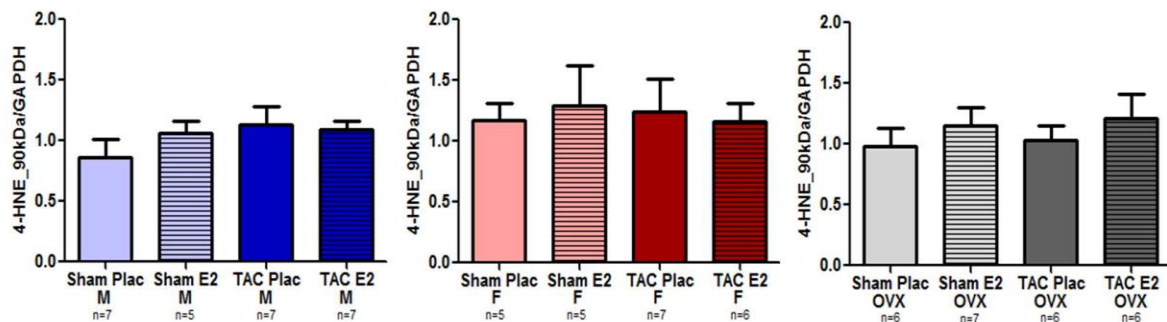
#### 4.7.4 TAC induziert oxidativen Stress in männlichen Mäusen

4-HNE ist ein reaktives Aldehyd, welches bei erhöhter ROS-Belastung durch Hydroxyl-Radikal-vermittelte Peroxidierung meist Plasmamembran-ständiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren entsteht. Daraus folgende Reaktionen mit Aminosäuren können Enzyme stark in ihrer Funktion beeinträchtigen. Mit Hilfe eines Anti-4-HNE-Antikörpers wurden in den einzelnen Gruppen 4-HNE-modifizierte Proteine aller Größen markiert. Dabei sollte das Ausmaß von oxidativem Stress bei TAC im Vergleich zur Kontrolle und das Einwirken von Östrogen evaluiert werden. Die Proteinmodifizierung wurde für Proteine der Größen 36 kDa und 90 kDa untersucht.

In den männlichen Tieren war nach vier Wochen MH-Entwicklung eine signifikant erhöhte Modifizierung von Proteinen der Größenordnung 36kDa durch 4-HNE im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abbildung 4.45). In den Weibchen und OVX-Tieren wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet. Die Proteinbanden der Größe 90 kDa zeigten keine signifikante Modifikation durch (4-HNE Abbildung 4.46).



**Abbildung 4.45: Darstellung der relativen 4-HNE-Modifizierung von Proteinen mit einer Molekularmasse von etwa 36 kDa.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit 0,05 an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.46: Darstellung der relativen 4-HNE-Modifizierung von Proteinen mit einer Molekularmasse von etwa 90 kDa.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq$  0,05, † gibt P-Wert mit  $\leq$  0,07 an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

## 4.8 Expressionsmuster von ER $\alpha$ und $\beta$ bei Hypertrophie und E2-Behandlung

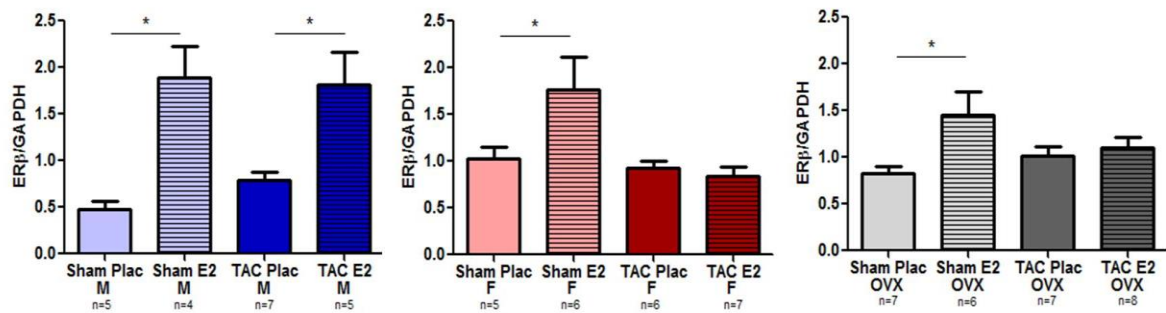
### 4.8.1 E2 erhöht die ER $\beta$ -Expression in Sham-Tieren

In den männlichen Tieren zeigte sich nach TAC keine signifikante Veränderung der ER $\beta$ -Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die E2-Behandlung führte zu einem starken Anstieg der ER $\beta$ -Expression (Abbildung 4.47). Auch in den Sham-Tieren war ER $\beta$  nach E2-Behandlung auf beinahe das Vierfache des Kontrollniveaus erhöht.

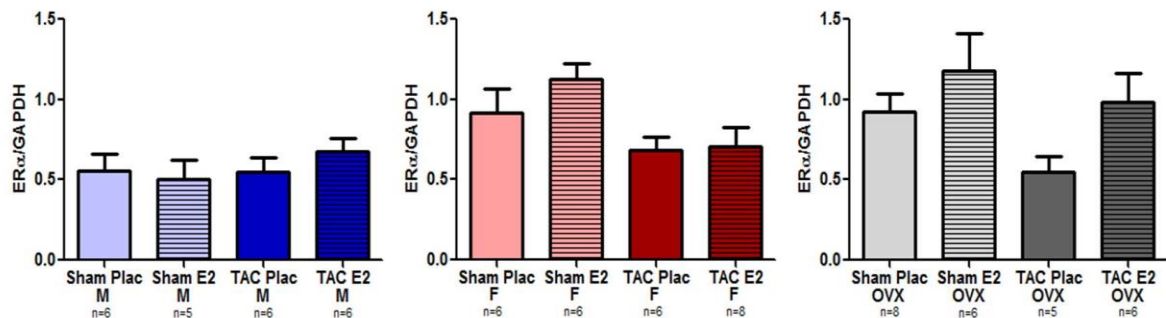
Nach vier Wochen MH-Entwicklung war in den Weibchen kein signifikanter Unterschied der ER $\beta$ -Proteinexpression relativ zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Eine E2-Behandlung führte ausschließlich in den Sham-Tieren zum signifikanten ER $\beta$ -Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin war ER $\beta$  in der Kontrollgruppe der Weibchen im Vergleich zu den männlichen Tieren signifikant höher exprimiert.

Auch in den OVX-Tieren hatte die TAC keinen signifikanten Effekt auf die ER $\beta$ -Expression relativ zur Kontrollgruppe. In den Sham-Tieren zeigte sich ebenfalls eine signifikante ER $\beta$ -Steigerung.

Bei Untersuchung der ER $\alpha$ -Proteinexpression (Abbildung 4.48) waren keine signifikanten Veränderungen zu verzeichnen. In den OVX-Tieren konnte jedoch nach vier Wochen MH-Entwicklung ein Trend zur ER $\alpha$ -Reduktion beobachtet werden. Die E2-Behandlung verhinderte diese Verminderung der ER $\alpha$ -Expression.



**Abbildung 4.47: Darstellung der relativen ER $\beta$ -Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abbildung 4.48: Darstellung der relativen ER $\alpha$ -Proteinexpression.** M = männlich; F = weiblich; OVX = ovariectomiert; TAC = Transversale Aortenkonstriktion; Plac = Placebo; E2 = östrogenbehandelt; n = Anzahl der Tiere; \* gibt den P-Wert mit  $\leq 0,05$  an. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

---

## 5 Diskussion

Zahlreiche Studien konnten Veränderungen des Energiestoffwechsels auf Ebene der Gen- und Proteinexpression bei MH und HF nachweisen. Häufig bezogen sich diese jedoch ausschließlich auf männliche Individuen<sup>56,73</sup>. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen GU auf vielen Ebenen des kardialen Metabolismus, insbesondere des mitochondrialen Stoffwechsels, unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Weiterhin wird gezeigt, dass eine E2-Behandlung häufig zu regulierenden Effekte auf Gen- und Proteinexpression des Energiestoffwechsels führt.

In dieser Studie wurden erstmalig Hinweise auf E2-Effekte auf die Fettsäurestoffwechselregulation bei drucklast-induzierter MH beschrieben. Es wurde beobachtet, dass ausschließlich Weibchen bei kompensierter Myokardhypertrophie von einer Senkung der PPAR $\beta/\delta$ -Gen- und Proteinexpression, sowie einer reduzierten Genexpression der PPAR $\beta/\delta$ -Zielgene betroffen waren. Dagegen wurde ausschließlich in Männchen und OVX mit Myokardhypertrophie eine verminderte PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression ermittelt. Diese Erkenntnisse sprechen für GU bei metabolischen Veränderungen im Rahmen einer TAC-induzierten Myokardhypertrophie. Daraus lässt sich schließen, dass in beiden Geschlechtern MH-assoziierte metabolische Veränderungen stattfanden. Diese wurden vermutlich durch verschiedene metabolische Schlüsselregulatoren vermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Herzfunktion ausschließlich in den Weibchen mit MH erhalten blieb. Dies weist auf eine günstigere Form der Stoffwechselveränderungen bei Hypertrophie in den weiblichen Tieren hin.

Unter E2-Behandlung blieb die PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression in weiblichen Tieren trotz MH stabil. In Männchen mit MH war bei E2-Behandlung keine Minderung der Expression der Schlüsselregulatoren PPAR $\alpha$  und PGC-1 $\alpha$  zu beobachten. Dementsprechend konnten in dieser Studie E2-vermittelte kardioprotektive Effekte in beiden Geschlechtern nachgewiesen werden.

Dieses Beispiel zeigt, dass die E2-Einflüsse im Geschlechtervergleich an verschiedenen Zielgenen des mitochondrialen Metabolismus ansetzen können. In der Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieoptionen für Herzinsuffizienz und MH könnten die kardioprotektiven E2-Wirkungen zum Beispiel durch PPAR-Stimulation imitiert werden<sup>89</sup>. Die Berücksichtigung von GU könnte dabei eine individuellere, geschlechtsspezifische Therapiestrategie ermöglichen.

Weiterhin wurde bei einer Vielzahl von Genen und Proteinen eine deutlich höhere Basalexpression in gesunden Weibchen im Vergleich zu gesunden Männchen gemessen. In vielen Fällen führte E2 zur Erhöhung der relativ niedrigen Basalexpression in

---

Männchen. Dies deutet auf eine höhere Leistungsfähigkeit des Energiestoffwechsels bei gesunden Weibchen hin, was als kardioprotektiver Effekt gewertet werden kann. Weiterhin weist dies darauf hin, dass dieser Effekt wahrscheinlich durch E2 vermittelt wurde.

## **5.1 Morphologie und Herzfunktion im Verlauf**

### **5.1.1 E2-Wirkungen auf die systolische Herzfunktion**

In allen Tieren dieses Mausmodells führte die kontinuierliche Drucklast-Exposition über vier Wochen zur erfolgreichen Induktion einer MH. Es wurde bereits beschrieben, dass das Ausmaß der TAC-induzierten MH in Männchen stärker ausgeprägt ist als in Weibchen<sup>16</sup>. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den Männchen nach vier Wochen TAC ein Trend zur höheren HW/TL und LVM/TL im Vergleich zu den weiblichen Tieren. Eine E2-vermittelte Hemmung der MH-Entwicklung wurde mehrfach beschrieben<sup>26,27</sup>. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den E2-behandelten weiblichen und OVX-Tieren nach vier Wochen TAC eine signifikant niedrigere LVM/TL (Abbildung 4.10) im Vergleich zur Kontrolle. Auch in den E2-behandelten Männchen war durch die signifikant reduzierte HW/TL eine Verminderung der MH im Vergleich zur Placebobehandlung zu verzeichnen (Abbildung 4.9). Dies bestätigte die MH-hemmenden Effekte einer E2-Behandlung.

Vier Wochen nach TAC-Induktion waren die Ejektionsfraktion (EF, Abbildung 4.11) und Verkürzungsfraktion (FS, Abbildung 4.12) als Parameter der Herzfunktion in den placebobehandelten Männchen und OVX signifikant vermindert. Dagegen blieben EF und FS bei den Weibchen unverändert. Die E2-Behandlung der Männchen und OVX führte jedoch im Vergleich zur Placebobehandlung zu einer deutlich höheren EF und FS. Weiterhin erreichten beide Parameter signifikant höhere Werte in den E2-behandelten weiblichen Sham-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse weisen auf fördernde Effekte der E2-Behandlung sowohl auf die Herzfunktion gesunder Weibchen als auch auf die kardiale Funktion bei MH-Entwicklung in beiden Geschlechtern hin.

In Analogie dazu beobachteten van Eickels et al. in E2-behandelten weiblichen OVX-Mäusen eine Hemmung der TAC-induzierten MH im Vergleich zur Placebobehandlung. Eine Studie von Westphal et al. an weiblichen OVX-TAC-Mäusen zeigte, dass die Behandlung mit E2 oder dem ER $\alpha$ -Agonisten 16 $\alpha$ -LE2 zur Verzögerung der Progression der MH-Entwicklung und zu einer signifikant höheren EF im Vergleich zur Placebobehandlung führte<sup>27</sup>. Auch Pelzer et al. beschrieben, dass in weiblichen OVX-Ratten mit hypertonie-induzierter MH eine 16 $\alpha$ -LE2-Behandlung zu niedrigeren Herzgewichten und zu einer höheren EF im Vergleich zur Placebo-Behandlung führte<sup>26</sup>. Diese Studien weisen auf kardioprotektive E2-Effekte hin, die durch die Verzögerung der

---

MH-Progression und die Aufrechterhaltung der Herzfunktion charakterisiert sind. Diesen Phänomenen liegen molekularbiologische Ursachen zugrunde, die noch nicht vollständig beschrieben wurden. Diese könnten für die Entwicklung neuer pharmakologischer Ansätze für die Therapie von MH und Herzinsuffizienz von großer Bedeutung sein.

## **5.2 E2-Wirkungen und GU im Glukosestoffwechsel bei MH**

### **5.2.1 E2-vermittelte Steigerung der Glut-Expression**

Die E2-Behandlung während der MH-Entwicklung führte in den männlichen Tieren zum Erhalt der Glut4-Expression auf signifikant höherem Niveau im Vergleich zur Placebobehandlung. Dieser Effekt könnte mit der ebenfalls erhöhten PGC-1 $\alpha$ -Expression in dieser Gruppe (Abbildung 4.28, Abbildung 4.29) in Zusammenhang stehen. Es wurde bereits für Skelettmuskelzellkulturen gezeigt, dass PGC-1 die Glut4-Expression durch Ko-Aktivierung des Transkriptionsfaktors MEF-2c steigern kann<sup>90</sup>. Weiterhin wurden bereits Hinweise für eine E2-abhängige positive PGC-1-Regulierung beschrieben<sup>91,92</sup>. Hsieh et al. beobachteten in Rattenherzen nach hämorrhagischem Trauma eine Reduktion der PGC-1-Proteinexpression. Eine E2-Behandlung führte zum Erhalt der kardialen PGC-1-Proteinexpression. Dies ging einher mit einem signifikant höheren Schlagvolumen im Vergleich zur Placebobehandlung<sup>91</sup>. Weiterhin zeigten Maher et al., dass die PGC-1-Genexpression in Skelettmuskel von E2-supplementierten Männern relativ zur Placebobehandlung signifikant erhöht war. In der vorliegenden Arbeit wurde die PGC-1 $\alpha$ -vermittelte Stabilisierung der Glut4-Expression während der MH-Entwicklung wahrscheinlich durch E2 stimuliert. Die Glut4-Werte der E2-behandelten Weibchen und OVX-Tiere waren nach vier Wochen TAC nicht wie bei den Männchen signifikant erhöht. Dies weist auf Geschlechterunterschiede in der E2-vermittelten Glut-Regulation bei MH hin.

Viele Arbeiten zeigten, dass hypertrophierte und insuffiziente Herzen einen Substratwechsel in Richtung Glukosestoffwechsel aufweisen<sup>70,71</sup>. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch vier Wochen nach TAC-Induktion eine Reduktion der Glut4- und Glut1-Expression in den weiblichen und männlichen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4.13). Dies spricht am wahrscheinlichsten dafür, dass in dieser Phase der MH-Entwicklung kein Substratwechsel vorlag. Diese Ergebnisse werden nur teilweise von der aktuellen Literatur bestätigt. In hypertrophierten Myozyten wurde beobachtet, dass die Glut1-Expression ansteigt, während die Glut4-Expression reduziert ist<sup>93</sup>. Dieser Prozess scheint eine verstärkte Insulin-unabhängige Glukoseaufnahme während der myokardialen Hypertrophie zu gewährleisten. Dagegen beobachteten Bugger et al. im Myokard herzinsuffizienter männlicher Ratten nach 20-wöchiger TAC

---

eine Glut4-Reduktion bei konstanter Glut1-Expression<sup>94</sup>. Hingegen konnten Razeghi et al. in humanem Myokardgewebe herzinsuffizienter Patienten neben der Reduktion von Glut4 einen Abfall der Glut1- Expression beobachten<sup>95</sup>. Letztere Beobachtung entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Das heißt, die verminderte Glut1- und Glut4-Expression könnte in der vorliegenden Arbeit bereits ein frühes metabolisches Zeichen für die Progression der MH hin zur Herzinsuffizienz darstellen und somit einen maladaptiven weiteren Verlauf signalisieren.

In den männlichen und OVX Sham-Tieren führte die E2-Behandlung zur signifikanten Steigerung der Glut1-Expression. Nach vierwöchiger TAC war diese E2-Wirkung im Vergleich zur Placebobehandlung nicht zu beobachten (Abbildung 4.14). Dies weist einerseits darauf hin, dass die Steigerung der Glut1-Expression wahrscheinlich durch E2 vermittelt wird. Andererseits führte die TAC zur Hemmung der E2-vermittelten Glut1-Steigerung in Männchen und OVX. Diese Ergebnisse spiegelten sich in den entsprechenden weiblichen Gruppen nicht wider. Dies könnte an dem höheren endogenen E2-Spiegel liegen. Eine E2-responsive Steigerung der Glut1-Expression bei Männchen und OVX könnte für E2-Effekte in beiden Geschlechtern sprechen. E2-Wirkungen auf die Glut1-Expression wurden bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass eine E2-Behandlung die Steigerung der Glut1-Expression in Hirnrindengewebe von Primaten<sup>96</sup> und in Zellkulturen fetaler Rattenlunge<sup>97</sup> bewirkt. Weiterhin wurde die Überexpression von Glut1 in Mäusen als ein Schutzmechanismus gegen HI beschrieben, der mit einer erhöhten Überlebensrate und einer Prävention von Herzinsuffizienz bei chronischer Druckbelastung einherging<sup>98</sup>. Dies spricht dafür, dass die in der vorliegenden Arbeit beschriebene E2-vermittelte Glut1-Steigerung eine kardioprotektive Wirkung hatte, da sie wahrscheinlich zur Förderung des Glukoseimports in die Zelle beitrug und damit die Glykolyse und schließlich ATP-Produktion anregte. Das kann als Vorteil für Myokard gewertet werden, das einer erhöhten Arbeitslast ausgesetzt und daher auf eine erhöhte Energieverfügbarkeit angewiesen ist. Die E2-Behandlung führte demnach durch die Erhöhung der Glut1-Expression wahrscheinlich zur Steigerung der metabolischen Leistungsfähigkeit des Myokardgewebes. Die niedrigere Glut1-Expression in placebobehandelten Männchen und Weibchen nach vier Wochen TAC spricht gegen eine fortgeschrittene MH-assoziierte metabolische Umstrukturierung im Sinne des Substratpräferenzen-Wechsels<sup>72</sup>. Es handelt sich demnach nicht nur in morphologischer und funktioneller sondern wahrscheinlich auch in metabolischer Hinsicht um ein Stadium kompensierter MH. Dagegen wiesen die OVX-Sham-Tiere die höchste Glut1-Expression auf. Dies könnte auf den endogenen E2-Verlust durch OVX zurückzuführen sein, der vermutlich zu einer Steigerung der E2-Rezeptordichte führte. Diese wird durch die signifikante Erhöhung der ER $\beta$ -Proteinexpression (Abbildung 4.47) bestätigt.



---

## 5.2.2 E2 steigert die Schlüsselenzyme der Glykolyse HK2 und PFKm nach OVX

Die Analysen der Hexokinase-2 (HK2, Abbildung 4.15) und der Phosphofruktokinase (PFKm, Abbildung 4.16) ergaben eine signifikante Steigerung der Expression beider Gene in den E2-behandelten OVX-Sham-Tieren. Auch für die zerebralen PFK und HK wurde eine E2-vermittelte Erhöhung der Enzymaktivität bei Rattenweibchen beschrieben<sup>99</sup>. Dies bestätigt, dass die Steigerung der Expressionen beider Schlüsselenzyme in den E2-behandelten OVX-Sham-Tieren wahrscheinlich durch E2 stimuliert worden ist. Daraus lässt sich ableiten, dass die E2-Behandlung stimulierende Wirkungen auf die Glykolyse ausübt und somit zur Steigerung der Energieverfügbarkeit führen könnte. Dieser Effekt könnte somit zur Erhöhung der myokardialen Leistungsfähigkeit beitragen, was als kardioprotektive E2-Wirkung gewertet werden könnte.

Weiterhin zeigten HK2 und PFKm eine signifikante Verminderung in den placebobehandelten Weibchen nach vier Wochen MH-Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für Skelettmuskel wurden stimulierende Effekte eines Glukose-Einstroms auf die HK2-Expression diskutiert<sup>100</sup>. Die niedrigere HK2-Expression in den placebobehandelten TAC-Weibchen könnte daher Folge eines wegen gesenkter Glut-1- und Glut-4 -Expression (Abbildung 4.14, Abbildung 4.13) reduzierten Glukose-Einstroms darstellen. Dennoch sollte in Bezug auf den Glukose-Einstrom generell berücksichtigt werden, dass eine Expressionsminderung nur unter Vorbehalt mit einem verminderten Glukose-Fluss gleichgesetzt werden kann, da ein gewisser Anteil an Glukosetransportern in intrazellulären Vesikeln lagert und bei Bedarf durch Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran mobilisiert werden kann<sup>101</sup>.

## 5.3 GU und E2-Effekte in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels

### 5.3.1 PPAR $\alpha$ und PGC-1 $\alpha$ dominieren die FAO-Regulation bei MH in Männchen

Eine chronisch erhöhte Drucklast führt zur Senkung der Expression von PPAR $\alpha$  und dessen Ko-Aktivator PGC-1 $\alpha$ <sup>102</sup>. Beide gelten als Schlüsselregulatoren im Prozess der metabolischen Umstrukturierung bei MH, der durch eine gedrosselte PPAR $\alpha$ -Aktivierung charakterisiert ist<sup>103</sup>.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Hypothese teilweise. Bei kompensierter Myokardhypertrophie (vier Wochen nach TAC) zeigte sich eine PGC-1 $\alpha$ - und PPAR $\alpha$ -Minderung bei den Männchen und OVX-Tieren, jedoch noch keine Veränderung bei den intakten Weibchen. So deutet die Genexpressionsanalyse für PPAR $\alpha$  (Abbildung 4.17) und PGC-1 $\alpha$  (Abbildung 4.28) auf eine frühere drucklast-induzierte Herabsenkung der PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression in den Männchen und OVX-Tieren im Vergleich zu den

---

Weibchen hin. Während sich in den männlichen und ovariectomierten Tieren nach vier Wochen TAC eine starke PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Senkung darstellte, waren bei den Weibchen keine signifikanten Veränderungen zu verzeichnen. Dies spricht für deutliche GU in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels. Diese Ergebnisse werden bestätigt durch eine Studie von Barger et al., die in Zellkulturen hypertropher Myozyten eine MH-assoziierte PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Inaktivierung sowie eine konsekutive Minderung der FAO-Enzymexpression nachwies. Dabei wurde diese Deaktivierung sowohl auf eine verminderte Expression, als auch auf eine schnelle Reduktion der PPAR $\alpha$ -Aktivität über den ERK-MAPK-Signalweg zurückgeführt<sup>103</sup>. Faerber et al. beschrieben eine signifikante Reduktion der PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression in männlichen Mäusen mit Herzinsuffizienz sieben Wochen nach minimalinvasiver TAC-Induktion. In Mäusen ohne Zeichen der Herzinsuffizienz war ausschließlich die PPAR $\alpha$ -Expression vermindert<sup>102</sup>. In der vorliegenden Arbeit waren sowohl die PPAR $\alpha$ - als auch die PGC-1 $\alpha$ -Expression vier Wochen nach TAC-Induktion vermindert. Die Reduktion beider Regulatoren könnte unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Faerber et al. ein metabolisches Zeichen der Progression zur Herzinsuffizienz bedeuten. Auch Garnier et al. beobachteten in Mäusen mit Aortenkonstriktion und Herzinsuffizienz eine signifikante Verminderung der PGC-1 $\alpha$ -Expression<sup>73</sup>. Dass die PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression unter E2-Behandlung in Männchen und OVX-Tieren erhalten blieb, spricht für eine E2-vermittelte Verhinderung der Progression der MH. Ebenfalls im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen zeigten Chen et al., dass eine E2-Behandlung ovariectomierter Mäuse mit Hypertropher Kardiomyopathie zur Verhinderung der Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion führte und dies mit einer signifikanten Steigerung der PGC-1 $\alpha$ -Expression assoziiert war<sup>25</sup>. Weiterhin beobachteten auch Rimbaud et al. bei der Untersuchung metabolischer Regulatoren in weiblichen Ratten, dass die kompensierte MH bei Weibchen sich ohne signifikante Veränderungen der PGC-1 $\alpha$ -Expression entwickelte<sup>29</sup>. Dies stützt die vorliegenden Daten zur PGC-1 $\alpha$ -Expression in den weiblichen Tieren.

Diese Studien weisen darauf hin, dass E2 die Aufrechterhaltung der PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression bei MH-Entwicklung fördert. Dies könnte erklären, warum es in den E2-behandelten TAC-Männchen nicht zur Verminderung der PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression im Vergleich zur Placebobehandlung kam. Die PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Genexpressionsmuster der OVX entsprachen jenen der männlichen Gruppen. Dies unterstreicht die regulatorische Rolle Östrogens im Fettsäurestoffwechsel und zeigt, dass E2 bei MH den metabolischen Phänotyp stabilisiert. Diese Annahme wird durch den Nachweis von Östrogen-responsiven Elementen (ERE) am PPAR $\alpha$ -Gen gestützt<sup>67</sup>.

Die im Stadium der kompensierten LVH beginnende metabolische Umstrukturierung (*metabolic remodeling*) in Männchen und OVX spiegelte sich jedoch nur teilweise auf

---

Proteinebene wider (Abbildung 4.18, Abbildung 4.29). Die Ergebnisse der PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression entsprachen in den männlichen und weiblichen Tieren etwa jenen der PGC-1 $\alpha$ -Genexpression. Die PPAR $\alpha$ -Proteinexpression war im Gegensatz zur Genexpression in Männchen und OVX nicht signifikant verändert. In den Weibchen blieb die PPAR $\alpha$ -Proteinexpression analog zur Genexpression unverändert.

Die besondere Bedeutung von PPAR $\alpha$  und E2 in der Ausprägung von Geschlechterunterschieden im kardialen Energiestoffwechsel ist bereits bekannt. So zeigte sich in einer Studie, dass eine CPT-1-Hemmung durch Etomoxir bei PPAR $\alpha$ -Knockout (PPAR $\alpha$ KO) zu hepatischer und kardialer Lipidakkumulation, Hypoglykämie und zu einer Mortalität von 100% der männlichen, aber nur 25% der weiblichen Mäuse führte. Eine vorausgegangene E2-Behandlung konnte den metabolischen Phänotyp bei den Männchen stabilisieren und somit die Mortalität senken, weshalb E2 neben PPAR $\alpha$  eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipidstoffwechsels zugeschrieben wurde<sup>59</sup>. Es zeigte sich durch die geschlechtsabhängig unterschiedlichen Mortalitäten, dass ein PPAR $\alpha$ -Mangel in den männlichen Tieren weniger gut kompensiert werden kann als in den weiblichen.

PPAR $\alpha$  ist sehr stark in Geweben mit hoher FAO-Rate wie dem Herzen exprimiert und vermittelt die Lipid-induzierte FAO-Aktivierung<sup>104</sup>. Zu seinen Zielstrukturen zählt daher auch eine Reihe von Genen des Fettsäurestoffwechsels.

Dazu gehören CPT-2<sup>52</sup>, dessen Genexpression in der vorliegenden Arbeit in allen TAC-Tieren vermindert war, sowie CPT-1<sup>52</sup>, die nach vier Wochen MH in den Weibchen und OVX-Tieren signifikant reduziert war (Abbildung 4.23, Abbildung 4.24). Die PPAR $\alpha$ -Expression war nach 4 Wochen TAC-Induktion ähnlich wie die CPT-1-Expression in den OVX-Tieren und die CPT2-Expression in den Männchen und OVX-Tieren vermindert. Dies bestätigt die wahrscheinliche Regulation dieser Zielgene durch PPAR $\alpha$ . Die E2-Behandlung führte zur signifikant erhöhten CPT-1-Expression in Weibchen und OVX-Tieren relativ zur Placebobehandlung. Dies entsprach für die OVX-Gruppen ebenfalls den PPAR $\alpha$ -Expressionsmustern und könnte als ein PPAR $\alpha$ -vermittelter E2-Effekt gewertet werden.

Auch MCAD und LCAD werden durch PPAR $\alpha$  reguliert<sup>52</sup> und weisen ebenfalls in der vorliegenden Arbeit PPAR $\alpha$ -entsprechende Expressionsmuster in den männlichen Tieren auf (Abbildung 4.25, Abbildung 4.26). Weiterhin bestätigten die UCP3-Expressionsmuster in den OVX-Tieren eine PPAR $\alpha$ -abhängige Regulation<sup>105</sup>. Dies zeigt, dass UCP3 vermutlich PPAR $\alpha$ -vermittelt durch E2 reguliert werden kann (Abbildung 4.42).

Diese Ergebnisse bestätigen die Regulation des Fettsäuremetabolismus durch PPAR $\alpha$  und deuten an, dass E2 über PPAR $\alpha$  an der Regulation der FAO beteiligt ist. PPAR $\alpha$  wurde eine zentrale Rolle in dem MH-assozierten metabolischen Remodeling

---

zugeschrieben<sup>55</sup>. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass dieser Prozess im Stadium kompensierter MH geschlechtsspezifisch bei Männchen mit einer PPAR $\alpha$ -Reduktion assoziiert war. Bei gleicher Dauer der TAC-induzierten MH spielt dies in weiblichen Tieren entweder eine untergeordnete Rolle, oder wäre erst bei progredienter MH zu erwarten.

Eine E2-vermittelte Regulation von Enzymen und Transportern des Fettsäuremetabolismus ist auch unabhängig von den PPARs denkbar. Es wurde bereits von einer höheren MCAD-Proteinexpression im weiblichen humanen Skelettmuskel berichtet<sup>106</sup>. Die Autoren diskutierten, dass womöglich ein E2-vermittelter Mechanismus dieser Beobachtung zugrunde liegen könnte. Diese Annahme wird durch den Nachweis eines östrogen-responsiven Elements (ERE) im Gen der MCAD untermauert. Dies spricht für eine direkte östrogene Einflussnahme auf die MCAD-Expression<sup>67</sup>. Diese Ergebnisse unterstützen die in den E2-behandelten OVX-Sham- und TAC-Tieren der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Expression von MCAD und LCAD (Abbildung 4.25, Abbildung 4.26).

Ferner wurde gezeigt, dass die skelettmuskuläre MCAD-Proteinexpression und  $\beta$ -Oxidation bei E2-behandelten Männern deutlich erhöht waren<sup>92</sup>. Dass die Acyl-CoA-Dehydrogenasen wichtige Komponenten des myokardialen Metabolismus sind, bestätigt zum Beispiel eine Studie von Cox et al., in der nach Deletion im LCAD-Gen sowohl bei weiblichen als auch männlichen Mäusen eine MH-Entwicklung beobachtet wurde<sup>107</sup>. Dabei zeigte sich, dass die MH bei Männchen signifikant stärker ausgeprägt war. Dagegen konnte durch eine Phytoestrogen-Diät eine signifikante Reduktion der MH bei Männchen erzielt werden. Bei den Weibchen hatte die Diät weder in WT, noch in LCAD-defizienten Tieren signifikante Einflüsse auf die MH<sup>107</sup>.

Dies deutet auf die Regulierbarkeit des kardialen Fettsäuremetabolismus durch Östrogen beim männlichen Geschlecht hin. Die vorliegenden Daten der E2-behandelten Männchen mit MH bestätigen diese Vermutung. Nach vier Wochen TAC wiesen sie signifikant höhere LCAD- und MCAD-Expressionen im Vergleich zur Placebobehandlung auf.

Die Effekte der TAC-Induktion und E2-Behandlung waren ausschließlich in Männchen und OVX durch die Regulation von PPAR $\alpha$  und PGC-1 $\alpha$  dominiert. Diese Regulation setzte sich auf Ebene der Zielgene dieser Regulatoren fort. Dies sind deutliche Hinweise auf GU und E2-Effekte in der Regulation des Fettsäuremetabolismus bei kompensierter MH.

### **5.3.2 PPAR $\beta/\delta$ dominiert die FAO-Regulation bei MH in Weibchen**

Im Gegensatz zu den Männchen zeigte sich in den Weibchen keine Veränderung der PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression. Dagegen zeigte sich eine Reihe von Veränderungen der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpressionsmuster (Abbildung 4.19) in den weiblichen Tieren.

---

Die PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression war sowohl in den E2-behandelten Sham-Weibchen als auch in den placebobehandelten TAC-Weibchen im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedriger. Daraus lässt sich einerseits schließen, dass kompensierte Myokardhypertrophie in Weibchen mit einer Verminderung der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression einhergeht. Andererseits kann eine E2-Behandlung von Weibchen ohne Myokardhypertrophie zur Senkung der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression führen. Dagegen ergab sich bei Weibchen mit E2-Behandlung und TAC eine Steigerung der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression. Dies deutet darauf hin, dass die E2-Behandlung während MH-Entwicklung zur Aufrechterhaltung der relativ hohen PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression in Weibchen beiträgt. Das heißt, die Wirkung der E2-Behandlung auf PPAR $\beta/\delta$  ist nicht nur abhängig vom Geschlecht und Ovariectomie, sondern auch von der Arbeitslast des Myokards und dem Vorhandensein einer MH. In einem Mausmodell drucklast-induzierter MH wurde der Energiemetabolismus zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht<sup>108</sup>. Dabei zeigte sich zwei Wochen nach TAC-Induktion ebenfalls ausschließlich in den weiblichen Tieren eine signifikante Reduktion der PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression. Dies steht im Einklang mit der TAC-induzierten PPAR $\beta/\delta$ -Verminderung in den weiblichen Tieren der vorliegenden Arbeit. Neun Wochen nach TAC-Induktion wurde hingegen eine signifikante PPAR $\beta/\delta$ -Senkung in Männchen und Weibchen beobachtet. Dies zeigte, dass der im frühen Stadium der MH manifeste Geschlechterschied in der PPAR $\beta/\delta$ -Expression mit Progression der MH nicht mehr bestand. Dieses Phänomen wäre demnach bei länger andauernder MH-Entwicklung auch in den Versuchstieren der vorliegenden Arbeit zu erwarten gewesen. Daraus lässt sich schließen, dass MH-assoziierte GU im Fettsäuremetabolismus vom Stadium der Hypertrophie abhängen könnten.

Die placebobehandelten Sham-Weibchen wiesen eine signifikant höhere PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression als die Sham-Männchen und -OVX auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese höhere physiologische PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression der gesunden Weibchen auf E2-Einflüsse zurückzuführen ist. Eine erhöhte konstitutive PPAR $\beta/\delta$ -Expression bei Weibchen konnten Maher et al. ebenfalls für Skelettmuskelgewebe nachweisen<sup>109</sup>. Dies stützt die vorliegenden Ergebnisse und ist ein weiteres Beispiel für eine höhere Basalexpression metabolischer Gene beim weiblichen Geschlecht im Vergleich zum männlichen. Diese könnte zu einer höheren Leistungsfähigkeit des weiblichen Energiestoffwechsels im Skelett- und vermutlich auch im Herzmuskel beitragen. Eine Regulierbarkeit der Genexpression von PPAR $\beta/\delta$  durch E2 ist wahrscheinlich, da auch das Vorhandensein eines ERE im PPAR $\beta/\delta$ -Gen bereits beschrieben wurde<sup>67</sup>.

Die Analyse der PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression (Abbildung 4.20) spiegelte die Ergebnisse der Genexpression nur partiell wider. Analog zur Genexpression zeigten sich ausschließlich in den weiblichen Gruppen deutliche Veränderungen der PPAR $\beta/\delta$ -

---

Proteinexpression. Dabei stellte sich der PPAR $\beta/\delta$ -Proteingehalt in den placebobehandelten Sham-Weibchen signifikant höher als in der männlichen und der OVX-Gruppe dar. Weiterhin bestätigte sich die verminderte Genexpression in einer ebenfalls signifikant verminderten PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression. Die Reduktion von Gen- und Proteinexpression dieses FAO-Regulators in Weibchen mit kompensierter MH weist auf beginnende metabolische Veränderungen hin, welche als Anpassung an die TAC-induzierte erhöhte Arbeitslast gewertet werden können<sup>110</sup>. Dabei scheint die Drosselung der FAO im Vordergrund zu stehen. Im Gegensatz zur Genexpression zeigte sich eine stark erhöhte PPAR $\beta/\delta$ -Proteinexpression in den E2-behandelten Sham-Weibchen. Diese Diskrepanz von Gen- und Proteinexpression könnte auf einer eventuellen E2-vermittelten Inhibition der PPAR $\beta/\delta$ -Proteindegradierung zurückzuführen sein. Überdies besitzen nukleäre Rezeptoren generell lange Halbwertszeiten<sup>111</sup>, sodass im weiteren Verlauf ein Angleich der Proteinexpression an die Genexpression zu erwarten wäre. Die auf Ebene der Genexpression nachgewiesene PPAR $\beta/\delta$ -Heraufregulierung in den E2-behandelten TAC-Weibchen bestätigte sich in der Proteinanalyse nicht. Auch hier kommt eine Latenz in der Proteinbiosynthese nach Erhöhung der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression als Ursache in Betracht.

Die frühe metabolische Umstrukturierung in den placebobehandelten TAC-Männchen war durch eine PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$ -Senkung charakterisiert. Dieser Prozess scheint bei Weibchen PPAR $\beta/\delta$ -abhängig abzulaufen. Einflüsse von PPAR $\beta/\delta$  auf wichtige Enzyme und Transporter des Fettsäuremetabolismus wurden vielfach beschrieben. Zu diesen gehören LCAD, MCAD, CPT-1, CPT-2, CD36<sup>62</sup>, ACOX<sup>112</sup>, UCP3<sup>58</sup>. Bei einigen dieser Gene entsprechen die Expressionsmuster in den weiblichen Gruppen gänzlich denen der PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression. Dies gilt für CD36 (Abbildung 4.22), CPT-1 (Abbildung 4.23), LCAD (Abbildung 4.26) und ACOX-1 (Abbildung 4.27). Die von ACOX-1 katalysierte Reaktion erfolgt unter Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>113</sup>. Die ACOX-1-Senkung könnte daher auch der kompensatorischen Eindämmung der ROS-Generierung dienen. Des Weiteren zeigte sich eine Verminderung der Genexpression von MCAD (Abbildung 4.25) und UCP3 (Abbildung 4.42) in den placebobehandelten Weibchen nach vier Wochen MH-Entwicklung analog zur PPAR $\beta/\delta$ -Expression. Weiterhin zeigten beide Gene ebenso wie PPAR $\beta/\delta$  eine höhere Expression in den E2-behandelten TAC-Weibchen relativ zur Kontrollgruppe. Mit Ausnahme der E2-behandelten TAC-Weibchen entsprach auch die CPT-2-Expression (Abbildung 4.24) in den weiblichen Gruppen dem PPAR $\beta/\delta$ -Expressionsmuster.

Diese Zusammenhänge deuten an, dass Hypertrophie oder eine E2-Behandlung ohne Hypertrophie bei Weibchen eine PPAR $\beta/\delta$ -abhängige Senkung des Fettsäuremetabolismus bedingen und eine E2-Behandlung Weibchen mit entstehender MH zur Aufrechterhaltung der FAO beitragen kann.

---

Für PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$  und eine Reihe ihrer Zielgene (CD36, CPT-1, CPT-2, ACOX1) zeigen die vorliegenden Daten eine erhöhte Basalexpression (Kontrollgruppe, Sham-Placebo-Tiere) in Weibchen verglichen mit Männchen und OVX. Für CD36 wurde bereits eine höhere Expression im weiblichen humanen Skelettmuskel im Vergleich zu männlichem beschrieben<sup>114</sup>.

MCAD und LCAD sind bei Weibchen im Vergleich zu OVX stärker repräsentiert. Dies deutet auf E2-vermittelte stabilisierende Effekte auf die Expression von FAO-Enzymen und somit auf die Förderung der FAO hin. Die niedrigere PPAR $\beta/\delta$ -Expression nach Ovariectomie (Abbildung 4.19) wird von den Ergebnissen von Rogers et al gestützt, die zeigten, dass die PPAR $\beta/\delta$ -Genexpression im Skelettmuskel von OVX-Mäusen im Vergleich zu den Sham-Tieren signifikant geringer ausfiel<sup>115</sup>. Dies kann als weitere Bestätigung der hier beschriebenen E2-abhängigen PPAR $\beta/\delta$ -Regulation gewertet werden. Dass die oben genannten Zielgene von PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  in Weibchen genau wie die beiden PPARs nach TAC in ihrer Genexpression gedrosselt wurden, bestätigt deren Regulierbarkeit durch diese nukleären Rezeptoren<sup>58,112</sup>. Zudem konnte die E2-Behandlung bei MH die Gen-Expression beider PPARs erhalten (Abbildung 4.19, Abbildung 4.21), was sich ebenfalls für die untersuchten Zielgene mit Ausnahme von CPT-2 signifikant darstellte.

### 5.3.3 E2 hemmt TAC-induzierte PPAR $\gamma$ -Reduktion in Weibchen

Obwohl PPAR $\gamma$  nur gering im Myokard exprimiert wird<sup>63</sup>, könnte dieser nukleäre Rezeptor eine wichtige Rolle für die Integrität des myokardialen Metabolismus und eine physiologische Herzfunktion spielen. PPAR $\gamma$ -Einflüsse auf Gene des Energiestoffwechsels wie CD36, ACOX, GLUT-1 wurden bereits beschrieben<sup>116</sup>. Ferner ist bekannt, dass ein PPAR $\gamma$ -Knockout in Mäusen zu MH, jedoch nicht zu herabgestufter Expression der Vertreter der FAO führte<sup>117</sup>. Weiterhin resultierte eine kardiomyozyten-spezifische PPAR $\gamma$ -Überexpression in moderater Hypertrophie ohne Einschränkung der Herzfunktion<sup>117</sup>. Dies betont die bedeutende Rolle dieses nukleären Rezeptors im kardialen Energiestoffwechsel und zeigt gleichzeitig, dass es weiterer Untersuchungen bedarf, um seine Funktion im Herzen präziser zu charakterisieren.

Hinweise auf eine Regulierbarkeit des nukleären Rezeptors durch E2 finden sich im Nachweis eines ERE im PPAR $\gamma$ -Gen<sup>67</sup>. Auch in Fettgewebe führte eine E2-Behandlung zur Erhöhung der PPAR $\gamma$ -Expression<sup>118</sup>.

In den Weibchen war die PPAR $\gamma$ -Genexpression ähnlich wie PPAR $\beta/\delta$  signifikant niedriger in den E2-behandelten Sham- und den placebobehandelten TAC-Tieren relativ zur Kontrolle. Im Unterschied zu PPAR $\beta/\delta$  scheint PPAR $\gamma$  bei Östrogengabe nach Ovariectomie gesteigert zu werden (Abbildung 4.21). Eine Minderung der PPAR $\gamma$ -

---

Expression in Aortengewebe nach Ovariectomie sowie eine PPAR $\gamma$ -Steigerung infolge E2-Behandlung wurde bereits beobachtet und stützt die vorliegenden Ergebnisse<sup>68</sup>. Weiterhin war neben dem PPAR $\gamma$ -Anstieg in den E2-behandelten OVX-Tieren auch eine signifikant erhöhte ER $\beta$ -Expression zu verzeichnen (Abbildung 4.47). Daher könnten die PPAR $\gamma$ -steigernden E2-Effekte durch die erhöhte Menge an ER $\beta$  begünstigt worden sein. Dennoch fand trotz Steigerung der ER-Expression in den E2-behandelten Sham-Weibchen keine Erhöhung der Expression von PPAR $\gamma$  und dessen Zielgenen wie ACOX-1, CD36 oder Glut1<sup>116</sup> statt (siehe Abbildung 4.27, Abbildung 4.22).

Scheinbar kommt es analog zu PPAR $\beta/\delta$  bei alleiniger E2-Behandlung der Sham-Weibchen zu einer Senkung der PPAR $\gamma$ -Expression während E2 in Kombination mit TAC-induzierter MH zu einem Mechanismus der PPAR $\gamma$ -Steigerung führen mag. Dieser paradox erscheinende Effekt wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Ein möglicher Grund für die PPAR $\gamma$ -Steigerung in den E2-behandelten TAC-Weibchen könnte der erhöhte kardiale Energiebedarf durch die Druckbelastung sein. Die E2-Behandlung würde unter diesen pathologischen Bedingungen demnach die metabolische Leistungsfähigkeit des Myokards fördern. Unter physiologischen Bedingungen wie in den Sham-Weibchen könnte E2 in Abwesenheit pathologischer Stimuli zur PPAR $\gamma$ -Reduktion führen. Möglicherweise könnte E2 dabei über einen anderen Signalweg agieren. Die Untersuchung dieses Phänomens, die zur weiteren Charakterisierung der Rolle Östrogens unter physiologischen und pathologischen Bedingungen im kardialen Stoffwechsel beitragen könnte, bedarf weiterer Analysen.

## **5.4 GU und E2-Effekte in der ETK-Biogenese**

### **5.4.1 TAC induziert kompensatorische mtDNA-Steigerung in Männchen**

Es ist bekannt, dass E2 die mtDNA-Transkriptionsrate erhöht. Eine positive mtDNA-Regulation durch E2 über NRF-1 und Tfam wurde in bereits für verschiedene Zelltypen beschrieben. Dazu zählen HepG2-Zellkulturen<sup>119</sup> und MCF-7-Zellkulturen<sup>47</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte ein NRF-1-steigernder Effekt von E2 auf die weiblichen E2-behandelten Sham-Tiere belegt werden (Abbildung 4.30). Dies spricht für eine Regulation der mtDNA-Transkription über NRF-1 und schließlich Tfam, wenn auch keine deutliche Tfam-Erhöhung zu verzeichnen war (Abbildung 4.31, Abbildung 4.39 bis Abbildung 4.41). Jedoch war bei den E2-behandelten Weibchen nach vier Wochen TAC keine Veränderung der Expression beider Transkriptionsfaktoren zu beobachten. Johann et al. beobachteten in Zellkulturen von Neuronen des lumbalen Rückenmarks männlicher Mäuse eine E2- und NRF-1-vermittelte Erhöhung der mtDNA-Expression<sup>120</sup>. Daraus ließ



---

sich schließen, dass die E2-Behandlung die Leistungsfähigkeit des Energiemetabolismus steigerte und somit neuroprotektive Effekte auf die neuronalen Zellen hatte.

Ähnlich wie bei vielen Genen der FAO war die Kopie-Anzahl von ND1 und COX3 in der weiblichen Kontrollgruppe signifikant höher als jene der männlichen Kontrollgruppe (Abbildung 4.39, Abbildung 4.40). Geschlechterunterschiede in der mtDNA-Genexpression beobachteten auch Borrás und Kollegen in hepatischen Mitochondrien von Ratten<sup>86</sup>. So wiesen sie eine signifikant höhere Expression des Gens für die mitochondrial kodierte 16srRNA bei Weibchen nach. Als ein Grund dafür wurde eine signifikant geringere oxidative mtDNA-Schädigung in den weiblichen Ratten im Vergleich zu den Männchen beschrieben. Bei OVX-Tieren war der oxidative Stress signifikant höher als bei weiblichen Wildtypen oder ovariectomierten Weibchen mit E2-Behandlung<sup>86</sup>. Dieser Mechanismus könnte neben NRF-1 (Abbildung 4.30) eine weitere Ursache der signifikant niedrigeren Zahl an ND1-, COX3-Kopien, sowie einer niedrigeren COX1-Proteinexpression in der OVX-Kontrollgruppe im Vergleich zur E2-Behandlung sein (Abbildung 4.39, Abbildung 4.41). Zudem war die Expression dieser mitochondrial kodierten Komplex-IV-Untereinheiten in den E2-behandelten OVX-Tieren nach vier Wochen MH-Entwicklung erhöht. Dies bestätigt wiederum die oben genannten Ergebnisse von Borrás et al. Daraus lässt sich ableiten, dass E2 auch im Myokard von OVX-Weibchen unter physiologischen (Sham) und pathologischen (TAC) Bedingungen die mtDNA-Expression fördert. Auch die Arbeit von Nilsen et al., die eine gesteigerte Expression der Untereinheiten COX1, COX2 und COX3 in Hirngewebe ovariectomierter Ratten beobachteten, stützt die vorliegenden Ergebnisse<sup>42</sup>. Die erhobenen Daten zu den OVX-Tieren bestätigen diese E2-Responsivität der Untereinheiten COX1 und COX3, und weisen auf gleiche Effekte bei COX7A2 (Abbildung 4.33) und ND1 (Abbildung 4.40) hin. Eine Gemeinsamkeit dieser 4 Gene liegt darin, dass sie Untereinheiten des Komplex IV der Elektronentransportkette (ETK) kodieren.

Vier Wochen nach TAC-Induktion führte die E2-Behandlung in den Männchen jedoch zu einer deutlich niedrigeren Zahl an ND1- und COX3-Kopien im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen zeigte sich bei den männlichen Sham-Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo- und E2-Behandlung. So scheint E2 bei Männchen in Kombination mit TAC eine mtDNA-senkende Wirkung auszuüben. In der Literatur wurde dieser Effekt noch nicht beschrieben. Dai et al zeigten in Kulturen von Myozyten mit angiotensininduzierter Hypertrophie, dass diese mit einer Stimulation der mitochondrialen Biogenese assoziiert war. Sie beobachteten eine Steigerung von Faktoren wie NRF-1, NRF-2 und Tfam, die die ETK-Synthese fördern<sup>121</sup>. Dies konnte als Anpassung an einen erhöhten Energiebedarf gewertet werden und stützt die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der mtDNA-Zahl in den männlichen TAC-Tieren. Unter E2-

---

Behandlung war keine mtDNA-Steigerung in den TAC-Männchen zu verzeichnen. Dies könnte bedeuten, dass die kompensatorische MH-assoziierte mtDNA-Erhöhung noch nicht stattfand. Demnach wäre von einem günstigeren MH-Stadium unter E2-Behandlung auszugehen.

Generell ist jedoch zu beachten, dass eine Erhöhung der Zahl von mtDNA-Kopien einerseits Ergebnis vermehrter Transkription sein könnte. Andererseits könnte sie das Korrelat einer vermehrten Mitochondrien-Anzahl sein.

Als wichtiger Regulator der Transkription mitochondrialer Gene der Atmungskettenkomplexe gilt die PGC-1 $\alpha$ -NRF-Tfam-Achse<sup>122</sup>. PGC-1 $\alpha$  gilt nicht nur als Ko-Aktivatoren von PPAR $\alpha$  in der Regulation der FAO<sup>64</sup>, sondern auch als Koordinator der von mitochondrialen und nukleären Genen ausgehenden Synthese von ETK-Komplexen<sup>117</sup>. In Anbetracht der in den placebobehandelten TAC-Männchen signifikant verminderten PGC-1 $\alpha$ -Expression (Abbildung 4.28) war demnach eine gleichsam reduzierte NRF-1- und Tfam-Expression anzunehmen. Jedoch wiesen die vorliegenden Ergebnisse keine PGC-1 $\alpha$ -entsprechenden Expressionsmuster auf (Abbildung 4.30, Abbildung 4.31). Auch für männlichen Ratten mit MH wurde bereits eine unveränderte Tfam-Expression beschrieben<sup>123</sup>. Dies ging einher mit unveränderter PGC-1 $\alpha$ -Expression. Jedoch waren dort die PGC-1 $\alpha$ -Aktivatoren SirT1 und AMPK herabreguliert<sup>123</sup>. Diese Ergebnisse waren ein Beispiel für schnell wirksame Veränderungen im Rahmen MH-assoziierten metabolischen Umstrukturierung. Im Myokardgewebe herzinsuffizienter Patienten wurde eine PGC1-unabhängige mtDNA-Verminderung nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen<sup>124</sup>.

Eindeutige Geschlechterunterschiede zeigten sich in der ND1- und COX3-Expression. Nach vier Wochen MH-Entwicklung waren ND1 und COX3 ausschließlich in den placebobehandelten Männchen um etwa das Vierfache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass mtDNA in der frühen Phase der MH kompensatorisch bei Männchen erhöht werden kann. Auch Meerson und Pomoinitsky fanden einen stark erhöhten mtDNA-Gehalt bei MH-Entwicklung in männlichen Ratten gemeinsam mit einer erhöhten Produktionsrate mitochondrialer RNA<sup>125</sup>. Die Autoren vermuteten, dass diese höhere Zahl an mtDNA einer beschleunigten RNA-Bildung als Anpassung an erhöhte Energieerfordernisse bei Drucklast dienen könnte.

Bei Hypertrophie kann es zu einer höheren Belastung durch ROS-Bildung kommen, was zu mtDNA-Schädigung und Störung der ETK-Synthese führen kann<sup>36</sup>. Daher wurde als mögliche Ursache eines hohen mtDNA-Gehalts auch die Kumulierung einer gewissen mtDNA-Reserve beschrieben, die bei erhöhtem Risiko für mtDNA-Schädigung durch ROS dennoch ausreichend fehlerfreie Transkriptionen von unbeschädigten mtDNA-Kopiervorlagen gewährleisten soll<sup>126</sup>. Eine komplette mtDNA-Replikation wird vermutlich

---

den mtDNA-Reparaturmechanismen vorgezogen, da sie energetisch günstiger abläuft<sup>127</sup>. Dies könnte auf die placebobehandelten Männchen nach vier Wochen MH-Entwicklung zutreffen, die eine signifikante ROS-Belastung in Form von 4-HNE-Proteinmodifizierungen aufwiesen (Abbildung 4.45, Abbildung 4.46).

Dieser Effekt zeichnete sich vier Wochen nach TAC in den placebobehandelten Weibchen nicht ab. Die Vermutung liegt nahe, dass dies mit der signifikant höheren mtDNA-Zahl zusammenhängt. Eine unveränderte mtDNA-Expression bei kompensierter MH in Weibchen fand sich ebenfalls in einer Studie von Rimbaud und Kollegen<sup>29</sup>. Dies war ein weiterer Hinweis dafür, dass die MH bei Weibchen auf metabolischer Ebene weniger fortgeschritten war als bei Männchen. Nach Karamanlidis et al. zählt die Senkung der mtDNA-Zahl zu den charakteristischen Ereignissen von Hypertrophie und geht der klinischen Manifestation der HI voraus<sup>128</sup>. Dies würde bezüglich der vorliegenden Ergebnisse bedeuten, dass dieses Stadium weder bei Männchen noch bei Weibchen erreicht wurde und man daher von einer frühen Phase kompensierter MH ausgehen kann. Bei Betrachtung der Proteinexpression der mitochondrial kodierten Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase COX1 (Abbildung 4.41) zeigte sich ein anderes Bild in den weiblichen und männlichen Gruppen. Im Gegensatz zur Genexpression von ND1 und COX3 war die COX-1-Proteinexpression nach vierwöchiger MH-Entwicklung in den Männchen nicht signifikant erhöht. Dies bestätigt die Annahme, dass die mtDNA-Kopien nicht zur Steigerung der Proteinexpression, sondern aufgrund eines erhöhten ROS-Schädigungsrisikos zur Aufrechterhaltung der regulären Biogenese vermehrt worden waren. Pohjoismäki et al. fanden bei neonatalen und adulten Ratten keinen Unterschied in der Ratio aus mitochondrialer und nukleärer DNA (mtDNA/nDNA), trotz höherer respiratorischer Kapazität und höherem Volumen der adulten Mitochondrien. Dies führte zu der Überlegung, dass die Zahl der mtDNA-Kopien weniger ausschlaggebend für mitochondriale Atmungskapazität und ETK-Synthese sein könnte<sup>122</sup>. Man kann jedoch davon ausgehen, dass eine Mindestanzahl an Kopien für eine uneingeschränkt ablaufende ETK-Synthese notwendig ist. Aus den oben genannten Gründen sind Rückschlüsse von mtDNA-Zahl auf die Beeinflussung der ATP-Bildung also prinzipiell kritisch zu betrachten.

Neben ROS und der PGC1 $\alpha$ -NRF1-Tfam-Achse sollten auch andere Einflüsse auf die mtDNA-Expression als mögliche Ursache der herabregulierten COX1-Proteinexpression in Betracht gezogen werden. Nach vier Wochen MH-Entwicklung war die COX1-Proteinexpression (Abbildung 4.41) in den Weibchen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit jenen zur PPAR $\beta/\delta$ -Expression (Abbildung 4.19). Es wurde bereits von einer Erhöhung der Anzahl an mtDNA-Kopien bei PPAR $\beta/\delta$ -Überexpression berichtet. Diese Ergebnisse konnten auch nach vier

---

Wochen TAC noch beobachtet werden<sup>62</sup>. Dies weist auf eine mögliche PPAR $\beta/\delta$ -assoziierte COX1-Regulation bei den Weibchen hin.

#### **5.4.2 Kompensierte MH mit erhaltener Proteinexpression der ETK-Komplexe**

Die Proteinexpression der Vertreter der einzelnen nukleär kodierten Atmungskettenkomplexe verblieb nahezu ohne signifikante Veränderungen. Eine Ausnahme war die TAC-induzierte UQCRC2-Steigerung (Komplex III) in den OVX-Tieren. Dies signalisiert ein Stadium kompensierter MH. Diese Resultate werden durch die Arbeit von Matlib et al. gestützt, in der keine morphologischen und funktionellen Veränderungen der Mitochondrien in einem Modell kompensierter MH gefunden wurden<sup>129</sup>. Weiterhin stehen diese Befunde im Einklang mit Ergebnissen einer TAC-Studie an Ratten von Doenst et al. So zeigten die Tiere nach zwei Wochen TAC keine Zeichen kardialer Dysfunktion. Bei Messung der Mitochondrienfunktion war eine höhere maximale respiratorische Kapazität zu verzeichnen als bei den Kontrolltieren. Herzinsuffizienz mit diastolischer Dysfunktion stellte sich erst zwischen sechster und zehnter Woche nach TAC-OP ein<sup>130</sup>. Demnach kann hier geschlussfolgert werden, dass auch in den hier dargestellten TAC-Gruppen eine kompensatorisch gesteigerte Atmungskettenaktivität mit unveränderter Proteinexpression vorliegt.

Dennoch fanden sich bereits Veränderungen einiger ETK-Komplexe auf Ebene der Genexpression. So ergab sich eine Senkung der ATP5k-Expression in der männlichen TAC-Plac-Gruppe (Abbildung 4.37), welche auf die verminderte PGC-1 $\alpha$ -Expression (Abbildung 4.28) zurückzuführen sein könnte. Dieses Ergebnis wird durch die Arbeit von Arany et al. gestützt, in der im PGC-1 $\alpha$ -KO-Modell eine erniedrigte Genexpression verschiedener ATP-Synthase-Untereinheiten nachgewiesen wurde<sup>131</sup>.

Die Komplex-IV-Untereinheit COX5 $\alpha$  wies keine bedeutend veränderte Genexpression in den männlichen und weiblichen Gruppen auf (Abbildung 4.32). Jedoch zeigte sich in den OVX-Tieren nach vier Wochen TAC eine signifikante COX5 $\alpha$ -Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Senkung der COX5 $\alpha$ -Expression war bei E2-Behandlung nicht zu beobachten. Daraus lässt sich ableiten, dass E2 bei Weibchen mit MH zur Erhaltung der nukleären Komplex-IV-Expression beiträgt. Die Sicherung der Integrität der ETK unter Bedingungen erhöhter Drucklast betont die kardioprotektive Wirkung von E2 auf den myokardialen Metabolismus. Weiterhin wurde das Gen der Untereinheit COX7A2 in den E2-behandelten OVX-Sham-Tieren stärker exprimiert (Abbildung 4.33) Dieser E2-Effekt war nicht in den OVX-TAC-Tieren zu beobachten. In Hirngewebe ovariectomierter Ratten konnte E2-Behandlung eine Steigerung der Komplex-IV-Expression über die Induktion der nukleär kodierten Untereinheit COX4 bewirken<sup>42</sup>. Die Vorliegenden Ergebnisse

---

bestätigen, dass E2-Einwirkungen die Genexpression von Untereinheiten einzelner ETK-Komplexe auch in myokardialem Gewebe steigern können.

Eine Veränderung der Expression der ETK-Komplexe bei MH ist in der Literatur sehr unterschiedlich beschrieben. Mögliche Ursachen dafür sind Unterschiede in den verwendeten Modellen und Untersuchungsmethoden:

Es wurde von einer vermindert exprimierten Komplex-I-Untereinheit im Gewebe insuffizienter humaner Herzen berichtet<sup>132</sup>, während in einem Modell der MH bei hypertonen Ratten eine Komplex-I-Untereinheit verstärkt exprimiert wurde<sup>40</sup>. An anderer Stelle zeigte sich dagegen bei MH hypertoner Ratten eine Reduktion der Komplex-I-Expression<sup>123</sup>.

Für Komplex II wurde eine Senkung der Proteinexpression im hypertrophierten Myokard hypertoner Ratten beschrieben<sup>40</sup>, wobei hier die Proteine mit Hilfe eines Massenspektrometrie-Verfahrens quantifiziert wurden. Andererseits war in Proteinexpressionsanalysen von Tang et al. nach Quantifizierung von ETK-Proteinen im gleichem Tiermodell keine signifikante Veränderung der Komplex-II-Expression zu verzeichnen<sup>123</sup>. Letzterer Befund steht wiederum im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen zur SDHB-Expression (Abbildung 4.35).

Dagegen findet sich in der Arbeit von Tang et al. eine signifikante Reduktion der Komplex-III-Expression in hypertonen Ratten mit MH<sup>123</sup>. Weiterhin wurde von einer Verminderung der Komplex-III-Expression in humanem Myokard bei Herzinsuffizienz berichtet<sup>40</sup>. Jedoch weisen andere Quellen auf eine Erhöhung der Komplex-III-Expression in hypertonen Ratten mit MH hin<sup>133</sup>.

Die hier vorliegenden Ergebnisse stehen teilweise in Einklang mit der derzeit veröffentlichten Literatur, die jedoch in sich heterogen ist. Dies ist auf unterschiedliche Versuchsmodelle, sowie verschiedene MH-Stadien zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit sprechen die Ergebnisse aus metabolischer Sicht bei unveränderter Proteinexpression der ETK-Komplexe für ein Stadium kompensierter MH. Erste Anzeichen einer Verminderung der Genexpression von ETK-Komplexen zeigen sich in männlichen (Abbildung 4.37) und OVX-Tieren (Abbildung 4.32). Diese Reduktion wurde durch E2 verhindert, was für protektive Effekte auf den myokardialen Metabolismus spricht.

## **5.5 E2 steigert antioxidative Systeme in Weibchen**

In vielen Studien wurde die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies und antioxidativer Schutzmechanismen im Zusammenhang mit MH und HI thematisiert<sup>36,46</sup>. In einer Arbeit von Lagranha et al. wurden GU in der ALDH2-Aktivität in einem Ischämie-

---

/Reperfusionmodell beschrieben. Dabei wurde bei weiblichen Ratten eine höhere Aktivität von ALDH2 nachgewiesen. Weibchen wiesen nach Ischämie und Reperfusion ein deutlich kleineres Infarktareal als Männchen auf. Jedoch konnte die Infarktzone bei Männchen durch E2-Behandlung verringert werden<sup>87</sup>. In der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich die Ergebnisse von Männchen und Weibchen bezüglich ALDH2 auch in ihrer basalen ALDH2-Proteinexpression signifikant (Abbildung 4.44). Hierbei scheint E2 eine Rolle zu spielen, da der ALDH2-Gehalt in der OVX-Kontrollgruppe im Vergleich zur weiblichen stark verringert war und beinahe das Niveau der männlichen Kontrollgruppe erreichte. Bei den Männchen war eine signifikante Steigerung der ALDH2-Expression nach TAC zu verzeichnen, die als Reaktion auf den drucklast-induzierten erhöhten oxidativen Stress gewertet wurde. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer von Jüllig et al. beschriebenen erhöhten ALDH2-Proteinexpression bei Ratten mit MH<sup>40</sup>.

Ähnlich wie für ALDH2 war auch die SOD2-Expression in der weiblichen Kontrollgruppe im Vergleich zur männlichen signifikant höher (Abbildung 4.43). Dies bestätigte die Ergebnisse von Borrás et al., die hepatische und zerebrale Mitochondrien von männlichen und weiblichen Ratten verglichen. Sie zeigten, dass die Expression an antioxidativen Systemen bei Weibchen höher war als bei Männchen<sup>86</sup>. So ergab sich eine signifikant höhere SOD2-Expression und -Aktivität in weiblichen Mitochondrien im Vergleich zu den männlichen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten jedoch eine signifikante SOD2-Senkung in den placebobehandelten TAC-Weibchen relativ zur Kontrollgruppe. Eine mögliche Ursache dafür könnte die reduzierte PPAR $\beta/\delta$ -Expression (Abbildung 4.19) in dieser Gruppe sein<sup>62</sup>. Die E2-Behandlung während der MH-Entwicklung führte zur signifikanten SOD2-Steigerung, was für antioxidative E2-Effekte spricht, die möglicherweise bei Weibchen E2-vermittelt über die Regulation von PPAR $\beta/\delta$  beeinflusst werden.

Weiterhin fanden Borrás et al. eine deutlich höhere Peroxid-Produktion in männlichen Mitochondrien einschließlich vermehrter oxidativer Schäden<sup>86</sup>. Dies bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit durch signifikant höhere 4-HNE-Proteinmodifizierungen nach vier Wochen MH-Entwicklung in den placebobehandelten Männchen (Abbildung 4.45). Die SOD2-Expression blieb ohne signifikante Veränderungen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten von Koga et al., die in einem Modell TAC-induzierter MH in männlichen Mäusen keine SOD2-Veränderungen beobachteten<sup>134</sup>. Dieser Befund spricht dafür, dass das untersuchte Myokardgewebe der placebobehandelten TAC-Männchen sich noch in einem kompensierten Stadium der Hypertrophie befand<sup>135</sup>. Bei längerer Dauer der TAC und somit zunehmender mitochondrialer Dysfunktion wäre mit einer weiteren Zunahme der ROS-Belastung zu rechnen<sup>136</sup>.

In Weibchen und OVX induzierte TAC eine Verminderung der UCP3-Expression (Abbildung 4.42). Eine MH-assoziierte Reduktion der UCP3-Expression wurde bereits beschrieben<sup>60</sup>. Bugger et al. sahen in diesem Effekt einen kompensatorischen

---

Mechanismus, der über eine bessere Kopplung von Zitratzyklus-Flux und mitochondrialer ATP-Synthese einen an die erhöhte Arbeitslast adaptierten Energiestoffwechsel bewirken könnte<sup>137</sup>.

Bei E2-Behandlung während vier Wochen MH-Entwicklung in den Weibchen mit und ohne OVX war diese UCP3-Senkung nicht vorhanden. Dies impliziert, dass die kompensatorische UCP3-Senkung noch nicht stattgefunden hatte. Folglich war aufgrund der E2-Einwirkung die Integrität des Energiestoffwechsels in diesen Tieren wahrscheinlich weniger gefährdet im Vergleich zur Placebobehandlung. Dies war ein Zeichen für eine aus metabolischer Sicht weniger stark fortgeschrittene MH. Damit in Einklang steht die relativ zur Kontrolle erhaltene EF in den OVX-Tieren (Abbildung 4.11).

## 5.6 E2 steigert ER $\beta$ -Expression in beiden Geschlechtern

Die ER $\beta$ -Expression war in den männlichen E2-behandelten Tieren mit und ohne MH-Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 4.47). Bei Weibchen und OVX zeigte sich jeweils nur in den E2-behandelten Sham-Tieren eine signifikant gesteigerte ER $\beta$ -Expression. Es ist bereits bekannt, dass die Östrogenrezeptoren durch E2-Behandlung heraufreguliert werden können<sup>120</sup>. Westphal et al. beschrieben Effekte von E2 auf weibliche OVX-Mäuse mit TAC-induzierter Myokardhypertrophie. Es wurde unter anderem der myokardiale Fibrosegrad anhand des Kollagengehalts bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die E2-Behandlung zur signifikanten Reduktion des myokardialen Kollagengehalts relativ zur Placebobehandlung führte<sup>27</sup>. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Fliegner et al., die die Effekte einer ER $\beta$ -Deletion in einem Mausmodell drucklast-induzierter MH untersuchten. Sie beobachteten in den weiblichen Tieren mit ER $\beta$ -Deletion einen starken TAC-induzierten Anstieg des Kollagengehalts im Vergleich zur Scheinoperation. In den weiblichen Wildtypen führte die TAC-Induktion jedoch nicht zur Zunahme der Fibrosierung. Dagegen zeigte sich nach TAC-Induktion in den männlichen Tieren mit ER $\beta$ -Deletion relativ zu den Wildtypen eine signifikant niedrigere myokardiale Fibrosierung bei jedoch stark erhöhter Apoptoserate<sup>16</sup>. Das heißt für die vorliegenden Ergebnisse, die Erhöhung der ER $\beta$ -Expression in den E2-behandelten männlichen TAC-Tieren könnte der Verhinderung erhöhter Apoptoseraten dienen. In den weiblichen und OVX-Tieren war keine ER $\beta$ -Erhöhung zu verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den Geschlechtern könnten auf die möglicherweise stärker fortgeschrittene MH in den männlichen Tieren zurückzuführen sein. Dies würde bedeuten, dass bei den weiblichen Tieren aufgrund des früheren MH-Stadiums eine kompensatorische Steigerung der ER $\beta$ -Expression noch nicht eingesetzt hatte.

Pereira et al. beschrieben eine erhöhte ROS-Belastung als mögliche Ursache einer ER $\alpha$ -Herabregulierung. Dies lässt vermuten, dass ähnliche Effekte die Steigerung der ER $\beta$ -

---

Expression in den E2-behandelten TAC-Weibchen verhindert haben könnten<sup>138</sup>. Dennoch zeigt die Analyse des Gehalts 4-HNE-modifizierter Proteine als ROS-Marker keine signifikanten Erhöhungen in den Weibchen nach vierwöchiger TAC (Abbildung 4.45, Abbildung 4.46). Andererseits wurde eine Heraufregulierung von ER $\beta$  bei Aortenstenose-Patienten und -Patientinnen berichtet<sup>139</sup>. Diese Beobachtungen spiegelten sich jedoch nicht in den vorliegenden Ergebnissen wider. Die Unterschiede in der Ergebnislage sind wahrscheinlich auf die sich unterscheidenden Versuchsmodelle und verschiedene Stadien der MH zurückzuführen.

Die vorliegenden Ergebnisse zu ER $\alpha$  zeigten keine signifikanten Veränderungen. Dies spricht für eine untergeordnete Rolle von ER $\alpha$  im Stadium kompensierter MH. Skavdahl et al. zeigten in einem TAC-Modell mit ER $\alpha$ -Knockout, dass die MH-Entwicklung nahezu jener der Wildtypen entsprach. Dagegen wurde bei ER $\beta$ -Knockout eine deutlich verstärkte MH beobachtet<sup>4</sup>. Daher wurde ER $\alpha$  nicht als ausschlaggebend in der Vorbeugung der MH erachtet. In einer anderen Studie konnte zwar durch Verabreichung eines ER $\alpha$ -Agonisten die MH-Entwicklung gehemmt werden, jedoch ging dies mit einer höheren Mortalität einher<sup>27</sup>. Die vorliegenden Ergebnisse zur ER $\alpha$ -Proteinexpression ergaben keine signifikanten Veränderungen. Dies suggeriert eine untergeordnete Rolle von ER $\alpha$  im Prozess der MH-Entwicklung. Weiterhin waren auch in einer Studie an OVX-Ratten mit MH weder nach Administration von E2 noch nach Behandlung mit dem ER $\alpha$ -Agonisten 16 $\alpha$ -LE2 signifikante Unterschiede der ER $\alpha$ -Expression zu verzeichnen<sup>26</sup>.

## 5.7 Bedeutung der metabolischen Veränderungen bei MH

In der Literatur wurde wiederholt diskutiert, ob die vorbeschriebene Umstrukturierung des Energiestoffwechsels eher adaptiven oder maladaptiven Charakters ist<sup>72</sup>. Nach wie vor bleibt diese Frage nicht gänzlich geklärt.

Van Bilsen et al. fassen in einer Review zusammen, dass viele Hinweise für eine vorteilhafte Auswirkung der metabolischen Ausrichtung auf Glukose statt FA sprechen<sup>72</sup>. Dennoch ließen auch Sie die Frage offen, ob die MH-assoziierten Veränderungen des Energiestoffwechsels Ursache oder lediglich Begleiterscheinung der MH-Progression bis zur HI darstellen. Tatsächlich scheint die Senkung der FAO zugunsten verstärkter Glukosemetabolisierung für den Erhalt der Herzfunktion bei MH von Vorteil zu sein. So konnte in einem Modell rechtsventrikulärer Hypertrophie gezeigt werden, dass die gezielte Förderung der Glykolyse sich positiv auf die kardiale Funktion auswirken kann. Die Glykolyserate wurde dabei indirekt über die Ausschaltung der Glykolyse hemmenden PDH-Kinase erhöht<sup>140</sup>.

Zur Produktion gleicher ATP-Mengen werden durch Glukoseoxidation etwa 10-15% weniger O<sub>2</sub> verbraucht als durch FAO<sup>141</sup>. Auch dies spricht für einen vorteilhaften,



---

adaptiven Charakter des Wechsels der Substratpräferenzen. Langfristig ist eine glukose-dominante Energiegewinnung jedoch wahrscheinlich ungünstiger, da ein physiologischer kardialer Metabolismus grundsätzlich einer gewissen Flexibilität bedarf, damit je nach Art und Dauer der Belastung das Verhältnis der verschiedenen Energiesubstrate zueinander (Kohlenhydrate, Fettsäuren, Laktat, Ketone) an die entsprechenden Arbeitsanforderungen des Herzens sowie die Stoffwechsellage des Körpers angepasst werden kann<sup>142</sup>. Diese Flexibilität geht dem myokardialen Energiestoffwechsel bei Festlegung auf Glukose als Hauptenergiequelle verloren<sup>135</sup>. Dies deutet drauf hin, dass die metabolischen Veränderungen bei MH kurzfristig adaptiver, jedoch langfristig maladaptiver Natur sein könnten. Ähnliche Überlegungen zur metabolischen Flexibilität könnten auch für die diabetische Kardiomyopathie bei erhöhter Insulinresistenz zutreffen. Diese ist im Gegensatz zur drucklast-induzierten MH durch eine Daueraktivierung der FAO gekennzeichnet. Daraus folgt auch bei dieser Entität ein Verlust der metabolischen Flexibilität, die schließlich zur Herzinsuffizienz beitragen könnte<sup>143</sup>. Daraus leitet sich ab, dass die Möglichkeit je nach Belastung zwischen unterschiedlichen Energieträgern zu wechseln noch wichtiger als die Präferenz eines bestimmten Substrates sein könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf Geschlechterunterschiede bei metabolischen Umbauprozessen bei MH hin. Auch hier ist zu klären, ob die unterschiedlich ablaufenden Anpassungsprozesse des Stoffwechsels bei Männchen und Weibchen auch unterschiedliche Bedeutungen für die Pathophysiologie der MH-Entwicklung haben. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten geschlechtsspezifischen Anpassungsvorgänge, die durch PPAR $\alpha$  oder PPAR $\beta/\delta$  koordiniert wurden, können vermutlich keine dauerhafte MH-Kompensation bewirken. Bei Weibchen scheinen die Zeichen eines maladaptiven Verlaufs wie die Senkung von Herzfunktionsparametern (Abbildung 4.11) deutlich später einzusetzen als bei Männchen<sup>16</sup>. Dies scheint im Zusammenhang mit den sich unterscheidenden Prozessen in der FAO bei MH stehen. Diese Anpassungsprozesse konnten bei MH-Entwicklung unter E2-Behandlung sowohl in Männchen als auch in Weibchen noch nicht beobachtet werden. Dies spricht für eine E2-vermittelte Stabilisierung des mitochondrialen Metabolismus bei drucklast-induzierter MH, die zur Verzögerung der MH-Progression beiträgt.

## 5.8 Fazit

In dieser Studie konnten erstmalig GU in der Regulation des Fettsäuremetabolismus im Rahmen eines frühen Stadiums drucklast-induzierter MH beschrieben werden. Dabei waren beim männlichen Geschlecht die Expressionen von PPAR $\alpha$  und PGC-1 $\alpha$  inklusive mehrerer Ziel-Gene bei MH vermindert. Analog zu den Männchen zeigten sich gleiche Veränderungen der beiden Regulatoren in den OVX-Gruppen. Folglich war dieses

---

Programm der Stoffwechsellanpassung mit niedriger endogener E2-Produktion assoziiert. Stattdessen zeigte sich bei den Weibchen ohne OVX eine Reduktion der PPAR $\beta/\delta$ -Expression, die sich in zahlreichen Zielgenen widerspiegelte. Bei beiden Geschlechtern konnte eine E2-Behandlung diesen MH-assoziierten Expressionsminderungen vorbeugen. Dies wies auf die kardioprotektive Wirkung Östrogens in beiden Geschlechtern hin.

Nur bei den placebobehandelten Männchen und OVX waren nach vier Wochen TAC die Herzfunktionsparameter EF und FS signifikant vermindert. Dies ließ schlussfolgern, dass die MH in diesen beiden Gruppen weiter fortgeschritten war als in den Weibchen. In den E2-behandelten Männchen und OVX wurden nach vier Wochen TAC blieben EF und FS erhalten. Somit scheint ein Zusammenhang der Einflüsse Östrogens auf die PPAR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Expression und der Erhaltung der Herzfunktion bei MH zu bestehen. Zudem waren bei Weibchen ohne OVX keine Einschränkungen von EF und FS zu verzeichnen, was für ein zu diesem Zeitpunkt günstigeres Stadium der MH spricht. Dies betonte die vorteilhafte Wirkung Östrogens auf den kardialen Energiestoffwechsel und die Herzfunktion in beiden Geschlechtern und zeigte, dass die PPAR $\beta/\delta$ -dominierten metabolischen Umstrukturierungen in den placebobehandelten TAC-Weibchen zu diesem Zeitpunkt nicht maladaptiver Natur waren. Diese Beobachtungen sprechen für eine Verzögerung der MH-Progression durch E2 in beiden Geschlechtern

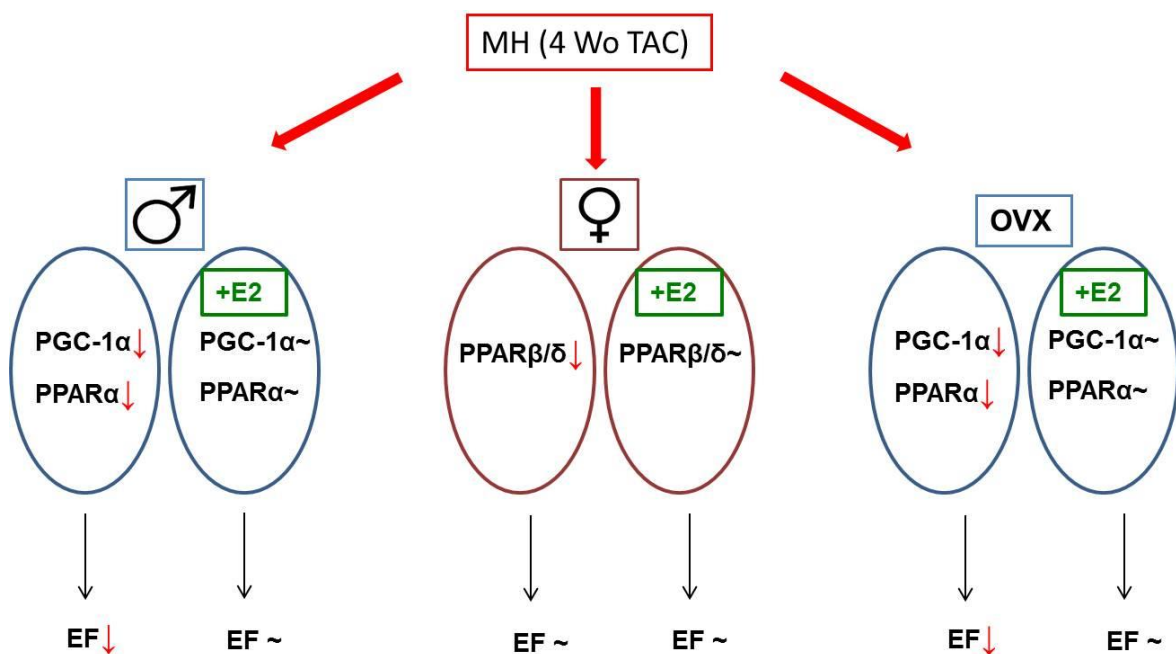
Die Expression der mitochondrial kodierten Gene ND1 und COX3 war in Männchen mit MH über das Dreifache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Bei den Weibchen lag die Expression beider Gene bereits in der Kontrollgruppe deutlich über jener der Männchen. Eine TAC-assoziierte Veränderung zeigte sich in den weiblichen Tieren nicht. Auch dies kann als Ausdruck der metabolischen Kompensation im Rahmen der bei Männchen weiter fortgeschrittenen MH-Entwicklung gewertet werden. In den E2-behandelten TAC-Männchen war dieser Anpassungsmechanismus nicht zu beobachten. Dies deutet an, dass die Anpassungsvorgänge der mtDNA-Genexpression bei drucklast-induzierter MH unter E2-Einwirkung zu diesem Zeitpunkt noch nicht relevant waren. Auch dies zeigte, wie eine E2-Behandlung auch bei Männchen den frühen metabolischen Veränderungen bei MH und damit der MH-Progression entgegenwirken konnte.

Im Vergleich der Kontrollgruppen ergab sich in vielen Fällen eine signifikant höhere Basalexpression von metabolischen Regulatoren und Zielgenen in den Weibchen. So wiesen die Weibchen im Vergleich zu den Männchen höhere Werte in der Expression von PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ , CPT-1, CPT-2, CD36, ACOX1, ND1, COX3, ALDH2, SOD2, HK2 auf. Mit Ausnahme der beiden letztgenannten Gene galt dies ebenso im Vergleich zu den OVX-Tieren. Dies ließ auf eine unter physiologischen Bedingungen höhere Leistungsfähigkeit des Energiestoffwechsels und antioxidativer Systeme bei Weibchen schließen und zeigte, dass dieser Effekt wahrscheinlich durch E2 vermittelt wurde.

Ausschließlich in männlichen Mäusen mit vierwöchiger MH zeigte sich eine höhere 4-HNE-Proteinmodifizierung relativ zur Kontrolle. Dies verdeutlichte den höheren oxidativen Stress in Männchen im Vergleich zu Weibchen. Dagegen wurde ausschließlich in Weibchen und OVX-Tieren eine Verminderung von SOD2 und UCP3 beobachtet, der durch E2-Behandlung vorgebeugt werden konnte. Diese Ergebnisse unterstreichen Geschlechterunterschiede im Umgang mit oxidativem Stress bei MH und zeigten, dass hier E2 vor allem Effekte in weiblichen Tieren aufwies.

### 5.8.1 Hypothetisches Modell

Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnissen wurde ein hypothetisches Modell entwickelt, welches die oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen TAC-induzierter MH, Regulation des Fettsäuremetabolismus und der Herzfunktion darstellt. Weiterhin zeigt sich in diesem Modell, welche Rolle E2 in der Vermittlung von GU in der FAO-Regulation bei MH spielt.



**Abbildung 5.49: Hypothetisches Modell zu E2-Wirkungen und Geschlechterunterschieden in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels in Assoziation zur Herzfunktion.** OVX = ovariectomiert, MH = Myokardhypertrophie, TAC = transversale Aortenkonstriktion, +E2 = mit Östrogenbehandlung, EF = Ejektionsfraktion, PPARβ/δ = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor β/δ, PGC-1α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor γ Ko-Aktivatoren 1α, ↓ = Verminderung der Expression, ~ = unveränderte Expression

### 5.9 Limitationen

Die Entwicklung einer LVH durch Etablierung einer transversalen Aortenkonstriktion (TAC) war Voraussetzung für die Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe der TAC ist die Generierung einer reproduzierbaren LVH möglich. Das Ausmaß der

---

Hypertrophie-Bildung ist jedoch vor allem von der Enge des um die Aorta platzierten konstringierenden Bindfadens abhängig und kann daher bei Lockerung auch bei Tieren gleichen Geschlechts zu differierenden Hypertrophie-Graden führen.

Weiterhin bestehen vielfältige Möglichkeiten eine MH-Entwicklung im Tiermodell zu erzielen. Beispiele dafür sind MH-Induktion durch Anthrazykline<sup>137</sup>, Züchtung von Ratten mit spontaner Hypertonie-Entwicklung<sup>40</sup>, Herzschrittmacherüberstimulation<sup>144</sup>, Konstriktion der Aorta abdominalis<sup>145</sup>. Diese heterogenen Modelle führten zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Studien in der Literaturrecherche.

Weiterhin muss auf die Komplexität von MH und HI hingewiesen werden. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf MH und den damit assoziierten Anpassungsprozessen im Energiestoffwechsel und ROS-Management. Als weitere wichtige MH-Einflussfaktoren gelten ebenso die Regulation des kardialen Kalzium-Haushalts<sup>146</sup>, der extrazellulären Matrix und Apoptose<sup>16</sup>, sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Sympathikus<sup>121</sup>.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten basieren auf Veränderungen von Gen- und Proteinexpression. Diese Angaben lassen noch keine definitive Aussage auf die Auswirkung auf den Metabolismus zu, da neben der Expression auch die Enzymaktivität einen entscheidenden Parameter für die letztendliche Auswirkung von Veränderungen auf metabolischer Ebene darstellt.

## **5.10 Ausblick und pharmakologische Ansatzpunkte**

Es wurde bereits viel in die Erforschung von Herzinsuffizienz und deren Prävention investiert. Dadurch konnten wichtige zugrundeliegende Pathomechanismen charakterisiert werden. Dies führte zur Etablierung wichtiger pharmakologischer Therapieoptionen für HI-Patienten. Zu diesen zählen  $\beta$ -Blocker, Diuretika, AT1-Rezeptorblocker und ACE-Hemmer<sup>147</sup>. In Anbetracht des demographischen Wandels bleibt HI dennoch eine Erkrankung mit steigender Prävalenz, die weitere Therapiestrategien erfordert<sup>2</sup>. Der mitochondriale Stoffwechsel wird vermehrt als Angriffspunkt innovativer Pharmaka in Betracht gezogen. Eine Berücksichtigung von GU könnte hierbei von großer Bedeutung sein.

Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen GU in der Expression von PPAR $\alpha$  und PPAR $\beta/\delta$  stellt sich nun die Frage, welche Auswirkungen die Agonisten beider nukleären Rezeptoren im Geschlechtervergleich im MH-Modell ausüben.

Es wurden bereits PPAR-agonistische Effekte an MH-Modellen untersucht, jedoch galten diese vor allem dem männlichen Geschlecht. Dabei zeigte sich, dass der PPAR $\alpha$ -Agonist Fenofibrat bei frühzeitigem Einsatz in Ratten mit MH nachweislich einem Substratwechsel vorbeugen konnte. Erfolgte die Administration jedoch nach Beginn der MH-assozierten

---

metabolischen Umstrukturierung, so führte die Fenofibrat-vermittelte PPAR $\alpha$ -Reaktivierung zur Verschlechterung der Herzfunktion<sup>60</sup>. Dies unterstreicht die Notwendigkeit bei pharmakologischen Eingriffen in den Energiestoffwechsel auch verschiedene metabolische Stadien der MH zu differenzieren. Es zeichnet sich ab, dass möglichst frühzeitige Interventionen vorteilhaft sein dürften. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass PPAR $\alpha$ -Agonist GW7646 in hypertrophierten Herzen neonataler Kaninchen zum Erhalt von PGC-1 $\alpha$  und der FAO führte. Dies war im Vergleich zur Placebobehandlung mit einer signifikant höheren Ejektionsfraktion assoziiert und konnte eine post-ischämische kontraktile Dysfunktion verhindern<sup>148</sup>. Bei Betracht dieser Studien an verschiedenen Spezies in Zusammenschau mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen GU in der FAO-Regulation bei Mäusen mit MH stellt sich die Frage, ob ein PPAR $\alpha$ -Agonist als potentielle Therapieoption für geschlechtsreife weibliche Patienten gelten kann. Die vorliegenden Daten zeigen, dass PPAR $\beta/\delta$  die FAO-Regulation bei MH in Weibchen dominiert. Daher könnten PPAR $\beta/\delta$ -Agonisten für Patientinnen eine geschlechtsspezifischere Therapiestrategie darstellen.

Der über Wochen applizierte PPAR $\beta/\delta$ -Agonist GW610742X führte in herzinsuffizienten männlichen Ratten zum Erhalt der ohne Agonisten stark reduzierten FAO und gleichzeitig zur Reduktion des rechtsventrikulären und pulmonalen Gewichts. Dennoch kam es zu keiner signifikanten Veränderung des linksventrikulären Gewichts und der LVEF<sup>89</sup>. Auch in dieser Studie blieb ungeklärt, ob diese PPAR $\beta/\delta$ -agonistischen Effekte ebenso in weiblichen Artgenossen zu beobachten wären oder ob Weibchen sogar mehr von einem PPAR $\beta/\delta$ -Agonisten profitieren würden.

Des Weiteren könnten Studien zur gezielten Blockierung einzelner E2-Signalwege wichtige Erkenntnisse bei der Suche pharmakologischer Alternativen der MH-/HI-Therapie bringen. Neben der Untersuchung der langsam wirksamen Effekte Östrogens auf die Transkription, könnten auch schnell wirksame Effekte von Bedeutung sein. Dazu zählen zum Beispiel die Signalwege der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) und der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK), welche durch E2 beeinflusst werden<sup>149</sup>.

Dieser Überblick über mögliche Therapieansatzpunkte bei MH und HI verdeutlicht, dass nach wie vor Forschungsbedarf zur Entwicklung stoffwechselspezifischer Therapiestrategien besteht, die dem prognostisch ungünstigen Fortschreiten von MH zu manifester HI gezielt sowohl bei Männern als auch bei Frauen entgegenwirken können.

---

## Literaturverzeichnis

1. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *American Heart Journal* 2001;141:334-41.
2. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:e147-e239.
3. Lam CSP. What Is Normal in HFNEF?The Case for HFpEF. *JACC: Heart Failure* 2014;2:541-3.
4. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, et al. Estrogen receptor- $\beta$  mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2005;288:H469-H76.
5. Edelmann F. Epidemiologie und Prognose der Herzinsuffizienz. *Herz* 2015;40:176-84.
6. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007;93:1137-46.
7. Cardiovascular Diseases (CVD's), Fact sheet N°317. 2015. at [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/.](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/)
8. Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Seeland U, Hetzer R. Sex and Gender Differences in Myocardial Hypertrophy and Heart Failure. *Circulation Journal* 2010;74:1265-73.
9. Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993;88:107-15.
10. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KL. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996;275:1557-62.
11. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, et al. Obesity and the Risk of Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 2002;347:305-13.
12. Masoudi FA, Havranek EP, Smith G, et al. Gender, age, and heart failure with preserved left ventricular systolic function. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;41:217-23.
13. Liao Y, Cooper RS, Mensah GA, McGee DL. Left Ventricular Hypertrophy Has a Greater Impact on Survival in Women Than in Men. *Circulation* 1995;92:805-10.
14. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, et al. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation* 1992;86:1099-107.
15. Kararigas G, Dworatzek E, Petrov G, et al. Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload. *European Journal of Heart Failure* 2014;16:1160-7.
16. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, et al. Female sex and estrogen receptor- $\beta$  attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2010;298:R1597-R606.
17. Choi K-C, Jeung E-B. The Biomarker and Endocrine Disruptors in Mammals. *Journal of Reproduction and Development* 2003;49:337-45.
18. Mendelsohn ME, Karas RH. The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. *New England Journal of Medicine* 1999;340:1801-11.
19. McDevitt MA, Glidewell-Kenney C, Jimenez MA, et al. New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: Evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008;290:24-30.

- 
20. Park M-A, Hwang K-A, Choi K-C. Diverse animal models to examine potential role(s) and mechanism of endocrine disrupting chemicals on the tumor progression and prevention: Do they have tumorigenic or anti-tumorigenic property? *Lab Anim Res* 2011;27:265-73.
  21. De Marinis E, Marino M, Ascenzi P. Neuroglobin, estrogens, and neuroprotection. *IUBMB Life* 2011;63:140-5.
  22. Prabhushankar R, Krueger C, Manrique C. Membrane Estrogen Receptors: Their Role in Blood Pressure Regulation and Cardiovascular Disease. *Current Hypertension Reports* 2013;16:1-7.
  23. Yang S-H, Liu R, Perez EJ, et al. Mitochondrial localization of estrogen receptor  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:4130-5.
  24. Meldrum DR. G-Protein-Coupled Receptor 30 Mediates Estrogen's Nongenomic Effects after Hemorrhagic Shock and Trauma. *The American journal of pathology* 2007;170:1148-51.
  25. Chen Y, Zhang Z, Hu F, et al.  $17\beta$ -estradiol prevents cardiac diastolic dysfunction by stimulating mitochondrial function: A preclinical study in a mouse model of a human hypertrophic cardiomyopathy mutation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2015;147:92-102.
  26. Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, et al. The estrogen receptor- $\alpha$  agonist  $16\alpha$ -LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 2005;67:604-12.
  27. Westphal C, Schubert C, Prella K, et al. Effects of Estrogen, an ER $\alpha$  Agonist and Raloxifene on Pressure Overload Induced Cardiac Hypertrophy. *PLoS ONE* 2012;7:e50802.
  28. Pedram A, Razandi M, Lubahn D, Liu J, Vannan M, Levin ER. Estrogen Inhibits Cardiac Hypertrophy: Role of Estrogen Receptor- $\beta$  to Inhibit Calcineurin. *Endocrinology* 2008;149:3361-9.
  29. Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, et al. Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009;46:952-9.
  30. Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B. The role of sex in cardiac function and disease This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young Investigator's Forum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2006;84:93-109.
  31. Stanley W, Chandler M. Energy Metabolism in the Normal and Failing Heart: Potential for Therapeutic Interventions. *Heart Failure Reviews* 2002;7:115-30.
  32. Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Mayr M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with  $^{14}\text{C}$ -labeled substrates in humans. *The Journal of Clinical Investigation* 1987;79:359-66.
  33. Jansson E, Sylvén C. Activities of key enzymes in the energy metabolism of human myocardial and skeletal muscle. *Clinical Physiology* 1986;6:465-71.
  34. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease. *Circulation* 2007;115:2540-8.
  35. Neubauer S. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *New England Journal of Medicine* 2007;356:1140-51.
  36. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovascular Research* 2009;81:449-56.
  37. Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium 2010.
  38. Guenthard J, Wyler F, Fowler B, Baumgartner R. Cardiomyopathy in respiratory chain disorders. *Archives of Disease in Childhood* 1995;72:223-6.
-

- 
39. Kalsi KK, Smolenski RT, Pritchard RD, Khaghani A, Seymour AML, Yacoub MH. Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Clinical Investigation* 1999;29:469-77.
  40. Jüllig M, Hickey AJR, Chai CC, et al. Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *PROTEOMICS* 2008;8:2556-72.
  41. Bugger H, Chemnitius J-M, Doenst T. Differential changes in respiratory capacity and ischemia tolerance of isolated mitochondria from atrophied and hypertrophied hearts. *Metabolism: clinical and experimental* 2006;55:1097-106.
  42. Nilsen J, Irwin RW, Gallaher TK, Brinton RD. Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *J Neurosci* 2007;27:14069-77.
  43. Bruni F, Polosa PL, Gadaleta MN, Cantatore P, Roberti M. Nuclear Respiratory Factor 2 Induces the Expression of Many but Not All Human Proteins Acting in Mitochondrial DNA Transcription and Replication. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:3939-48.
  44. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & Development* 2004;18:357-68.
  45. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006;97:673-83.
  46. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative Stress and Mitochondrial DNA Damage in Heart Failure. *Circulation Journal* 2008;72:A31-A7.
  47. Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Barch MJ, Klinge CM. Estradiol Stimulates Transcription of Nuclear Respiratory Factor-1 and Increases Mitochondrial Biogenesis. *Molecular Endocrinology* 2008;22:609-22.
  48. Heather LC, Howell NJ, Emmanuel Y, et al. Changes in Cardiac Substrate Transporters and Metabolic Proteins Mirror the Metabolic Shift in Patients with Aortic Stenosis. *PLoS ONE* 2011;6:e26326.
  49. Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Waterham HR, Wanders RJA. Carnitine–acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 2004;25:521-32.
  50. McGarry JD, Brown NF. The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System — From Concept to Molecular Analysis. *European Journal of Biochemistry* 1997;244:1-14.
  51. Varanasi U, Chu R, Chu S, Espinosa R, LeBeau MM, Reddy JK. Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994;91:3107-11.
  52. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews* 1999;20:649-88.
  53. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
  54. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-66.
  55. Barger PM, Kelly DP. PPAR Signaling in the Control of Cardiac Energy Metabolism. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2000;10:238-45.
  56. Wagner RA, Tabibiazar R, Powers J, Bernstein D, Quertermous T. Genome-wide expression profiling of a cardiac pressure overload model identifies major metabolic and signaling pathway responses. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2004;37:1159-70.
  57. Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2004;61:393-416.
-



- 
58. Cheng L, Ding G, Qin Q, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;313:277-86.
  59. Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, et al. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation* 1998;102:1083-91.
  60. Young ME, Laws FA, Goodwin GW, Taegtmeyer H. Reactivation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  Is Associated with Contractile Dysfunction in Hypertrophied Rat Heart. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:44390-5.
  61. Young ME, Patil S, Ying JUN, et al. Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in the adult rodent heart. *The FASEB Journal* 2001;15:833-45.
  62. Liu J, Wang P, Luo J, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  Activation in Adult Hearts Facilitates Mitochondrial Function and Cardiac Performance Under Pressure-Overload Condition. *Hypertension* 2011;57:223-30.
  63. Barbieri M, Di Filippo C, Esposito A, et al. Effects of PPARs Agonists on Cardiac Metabolism in Littermate and Cardiomyocyte-Specific PPAR- $\gamma$  –Knockout (CM-PGKO) Mice. *PLoS ONE* 2012;7:e35999.
  64. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20:1868-76.
  65. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, et al. *Erra* and *Gabpa/b* specify PGC-1 $\alpha$ -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:6570-5.
  66. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Coactivator 1 $\beta$  (PGC-1 $\beta$ ), A Novel PGC-1-related Transcription Coactivator Associated with Host Cell Factor. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:1645-8.
  67. Bourdeau V, Deschênes J, Métivier R, et al. Genome-Wide Identification of High-Affinity Estrogen Response Elements in Human and Mouse. *Molecular Endocrinology* 2004;18:1411-27.
  68. Tiyerili V, Müller CFH, Fung S, Panek D, Nickenig G, Becher UM. Estrogen improves vascular function via peroxisome-proliferator-activated-receptor- $\gamma$ . *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012;53:268-76.
  69. Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, Höfer D, Gnaiger E. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011;43:1729-38.
  70. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *The Journal of Physiology* 2004;555:1-13.
  71. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;40:271-7.
  72. van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovascular Research* 2009;81:420-8.
  73. Garnier A, Fortin D, Deloménie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *The Journal of Physiology* 2003;551:491-501.
  74. Canton M, Menazza S, Sheeran FL, Polverino de Laureto P, Di Lisa F, Pepe S. Oxidation of Myofibrillar Proteins in Human Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;57:300-9.
-

- 
75. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 2005;120:483-95.
  76. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 2009;417:1-13.
  77. Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research* 2007;75:770-81.
  78. Faraci FM, Didion SP. Vascular Protection: Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004;24:1367-73.
  79. Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995;92:6264-8.
  80. Maulik SK, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2012;22:359-66.
  81. He L, Liu B, Dai Z, et al. Alpha lipoic acid protects heart against myocardial ischemia-reperfusion injury through a mechanism involving aldehyde dehydrogenase 2 activation. *European Journal of Pharmacology* 2012;678:32-8.
  82. Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science* 2008;321:1493-5.
  83. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1998;1363:100-24.
  84. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 1973;134:707-16.
  85. Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, et al. 17 $\beta$ -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NF $\kappa$ B cascade. *Aging Cell* 2005;4:113-8.
  86. Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;34:546-52.
  87. Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex Differences in the Phosphorylation of Mitochondrial Proteins Result in Reduced Production of Reactive Oxygen Species and Cardioprotection in Females. *Circulation Research* 2010;106:1681-91.
  88. Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, et al. Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *European Journal of Endocrinology* 2003;149:351-62.
  89. Jucker BM, Doe CP, Schnackenberg CG, et al. PPAR $\delta$  Activation Normalizes Cardiac Substrate Metabolism and Reduces Right Ventricular Hypertrophy in Congestive Heart Failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2007;50.
  90. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;98:3820-5.
  91. Hsieh Y-C, Yang S, Choudhry MA, et al. PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2005;289:H2665-H72.
  92. Maher AC, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Men supplemented with 17 $\beta$ -estradiol have increased  $\beta$ -oxidation capacity in skeletal muscle. *Physiological Genomics* 2010;42:342-7.
-

- 
93. Montessuit C, Thorburn A. Transcriptional Activation of the Glucose Transporter GLUT1 in Ventricular Cardiac Myocytes by Hypertrophic Agonists. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:9006-12.
  94. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovascular Research* 2010;85:376-84.
  95. Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeier H. Metabolic Gene Expression in Fetal and Failing Human Heart. *Circulation* 2001;104:2923-31.
  96. CHENG CM, COHEN M, WANG J, BONDY CA. Estrogen augments glucose transporter and IGF1 expression in primate cerebral cortex. *The FASEB Journal* 2001;15:907-15.
  97. Hart CD, Flozak AS, Simmons RA. Modulation of Glucose Transport in Fetal Rat Lung: A Sexual Dimorphism. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1998;19:63-70.
  98. Liao R, Jain M, Cui L, et al. Cardiac-Specific Overexpression of GLUT1 Prevents the Development of Heart Failure Attributable to Pressure Overload in Mice. *Circulation* 2002;106:2125-31.
  99. Kostanyan A, Nazaryan K. Rat brain glycolysis regulation by estradiol-17 beta. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1992;1133:301-6.
  100. Tsao T-S, Burcelin R, Charron MJ. Regulation of Hexokinase II Gene Expression by Glucose Flux in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:14959-63.
  101. Hirshman MF, Goodyear LJ, Wardzala LJ, Horton ED, Horton ES. Identification of an intracellular pool of glucose transporters from basal and insulin-stimulated rat skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:987-91.
  102. Faerber G, Barreto-Perreira F, Schoepe M, et al. Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: Reduced peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2011;141:492-500.e1.
  103. Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  during cardiac hypertrophic growth. *The Journal of Clinical Investigation* 2000;105:1723-30.
  104. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-66.
  105. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, et al. The cardiac phenotype induced by PPAR $\alpha$  overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* 2002;109:121-30.
  106. Maher AC, Akhtar M, Vockley J, Tarnopolsky MA. Women Have Higher Protein Content of  $\beta$ -Oxidation Enzymes in Skeletal Muscle than Men. *PLoS ONE* 2010;5:e12025.
  107. Cox KB, Liu J, Tian L, Barnes S, Yang Q, Wood PA. Cardiac hypertrophy in mice with long-chain acyl-CoA dehydrogenase or very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lab Invest* 2009;89:1348-54.
  108. Fliegner D. Geschlechterunterschiede bei drucklast-induzierter Myokardhypertrophie im Mausmodell - Einfluss von Östrogenrezeptor  $\beta$ . In: *Institute of Gender in Medicine H-UB, ed. Berlin*2008.
  109. Maher AC, Fu MH, Isfort RJ, Varbanov AR, Qu XA, Tarnopolsky MA. Sex Differences in Global mRNA Content of Human Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 2009;4:e6335.
  110. Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115:547-55.
-

- 
111. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Is Linked to Ligand-dependent Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:18527-33.
  112. Cheng L, Ding G, Qin Q, et al. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-[delta] deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med* 2004;10:1245-50.
  113. Van Veldhoven PP. Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *Journal of Lipid Research* 2010;51:2863-95.
  114. Kiens B, Roepstorff C, Glatz JFC, et al. Lipid-binding proteins and lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle: influence of physical activity and gender. *Journal of Applied Physiology* 2004;97:1209-18.
  115. Rogers NH, Perfield II JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Loss of ovarian function in mice results in abrogated skeletal muscle PPAR $\delta$  and FoxO1-mediated gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;392:1-3.
  116. Fliegner D, Westermann D, Riad A, et al. Up-regulation of PPAR $\gamma$  in myocardial infarction. *European Journal of Heart Failure* 2008;10:30-8.
  117. Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-Specific Knockout and Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Both Induce Cardiac Hypertrophy in Mice. *Circulation Research* 2005;97:372-9.
  118. Sato H, Sugai H, Kurosaki H, et al. The Effect of Sex Hormones on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Expression and Activity in Mature Adipocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2013;36:564-73.
  119. Chen J, Gokhale M, Li Y, Trush MA, Yager JD. Enhanced levels of several mitochondrial mRNA transcripts and mitochondrial superoxide production during ethinyl estradiol-induced hepatocarcinogenesis and after estrogen treatment of HepG2 cells. *Carcinogenesis* 1998;19:2187-93.
  120. Johann S, Dahm M, Kipp M, Beyer C, Arnold S. Oestrogen Regulates Mitochondrial Respiratory Chain Enzyme Transcription in the Mouse Spinal Cord. *Journal of Neuroendocrinology* 2010;22:926-35.
  121. Dai D-F, Johnson SC, Villarín JJ, et al. Mitochondrial Oxidative Stress Mediates Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and G $\alpha$ q Overexpression-Induced Heart Failure. *Circulation Research* 2011;108:837-46.
  122. Pohjoismäki JLO, Boettger T, Liu Z, Goffart S, Szibor M, Braun T. Oxidative stress during mitochondrial biogenesis compromises mtDNA integrity in growing hearts and induces a global DNA repair response. *Nucleic Acids Research* 2012;40:6595-607.
  123. Tang Y, Mi C, Liu J, Gao F, Long J. Compromised mitochondrial remodeling in compensatory hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rat. *Cardiovascular Pathology* 2014;23:101-6.
  124. Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F, Tian R. Defective DNA Replication Impairs Mitochondrial Biogenesis In Human Failing Hearts. *Circulation Research* 2010;106:1541-8.
  125. Meerson FZ, Pomoinitsky VD. The role of high-energy phosphate compounds in the development of cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1972;4:571-97.
  126. Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, et al. Overexpression of Mitochondrial Transcription Factor A Ameliorates Mitochondrial Deficiencies and Cardiac Failure After Myocardial Infarction. *Circulation* 2005;112:683-90.
  127. Bendich AJ. Hypothesis Mitochondrial DNA, chloroplast DNA and the origins of development in eukaryotic organisms. 2010.
-

- 
128. Karamanlidis G, Bautista-Hernandez V, Fynn-Thompson F, del Nido P, Tian R. Impaired Mitochondrial Biogenesis Precedes Heart Failure in Right Ventricular Hypertrophy in Congenital Heart Disease. *Circulation: Heart Failure* 2011;4:707-13.
  129. Matlib MA, Rembert JC, Millard RW, et al. Mitochondrial function in canine experimental cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1983;15:221-32.
  130. Doenst T, Pytel G, Schrepper A, et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovascular Research* 2010;86:461-70.
  131. Arany Z, He H, Lin J, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metabolism* 2005;1:259-71.
  132. Li W, Rong R, Zhao S, et al. Proteomic analysis of metabolic, cytoskeletal and stress response proteins in human heart failure. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2012;16:59-71.
  133. Jin X, Xia L, Wang L-S, et al. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats. *PROTEOMICS* 2006;6:1948-56.
  134. Koga K, Kenessey A, Ojamaa K. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2013;304:H282-H93.
  135. Rosca MG, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*;55:31-41.
  136. Schwarzer M, Osterholt M, Lunkenbein A, Schrepper A, Amorim P, Doenst T. Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure. *The Journal of Physiology* 2014;592:3767-82.
  137. Bugger H, Guzman C, Zechner C, Palmeri M, Russell K, Russell R, III. Uncoupling protein downregulation in doxorubicin-induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2011;67:1381-8.
  138. Pereira-Simon S, Xia X, Catanuto P, Elliot S. Oxidant Stress and Mitochondrial Signaling Regulate Reversible Changes of ER $\alpha$  Expression and Apoptosis in Aging Mouse Glomeruli and Mesangial Cells. *Endocrinology* 2012;153:5491-9.
  139. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, et al. Upregulation of Myocardial Estrogen Receptors in Human Aortic Stenosis. *Circulation* 2004;110:3270-5.
  140. Piao L, Marsboom G, Archer S. Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *Journal of Molecular Medicine* 2010;88:1011-20.
  141. Nagoshi T, Yoshimura M, Mc Rosano G, D Lopaschuk G, Mochizuki S. Optimization of cardiac metabolism in heart failure. *Current pharmaceutical design* 2011;17:3846-53.
  142. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2011;1813:1360-72.
  143. Alpert MA. Obesity Cardiomyopathy:: Pathophysiology and Evolution of the Clinical Syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences* 2001;321.
  144. Lei B, Lionetti V, Young ME, et al. Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*;36:567-76.
  145. Jacob MHVM, Pontes MRN, Araújo ASR, et al. Aortic-banding induces myocardial oxidative stress and changes in concentration and activity of antioxidants in male Wistar rats. *Life Sciences* 2006;79:2187-93.
-

- 
146. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23-49.
  147. Massie BM. Novel targets for the treatment of heart failure: Perspectives from a heart failure clinician and trialist. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011;51:438-40.
  148. Lam VH, Zhang L, Huqi A, et al. Activating PPAR $\alpha$  Prevents Post-Ischemic Contractile Dysfunction in Hypertrophied Neonatal Hearts. *Circulation Research* 2015;117:41-51.
  149. Kilić A, Javadov S, Karmazyn M. Estrogen exerts concentration-dependent pro-and anti-hypertrophic effects on adult cultured ventricular myocytes. Role of NHE-1 in estrogen-induced hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009;46:360-9.

---

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Malick Dansokho, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

### **Einfluss von Östrogen auf den mitochondrialen Metabolismus bei drucklast-induzierter Myokardhypertrophie**

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

---

## **Lebenslauf**

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



---

## Kongressbeiträge

### Posterpräsentationen

Malick Dansokho, Daniela Fliegner, Carola Schubert, Jenny Thomas, Vera Regitz-Zagrosek. *Effects of 17 $\beta$ -Oestradiol on Fatty Acid Metabolism in Pressure Overload-induced Cardiac Hypertrophy*. Posterbeitrag, Internationaler Genderkongress, Berlin September 2015.

---

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Professorin Regitz-Zagrosek für die Themenvergabe und die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Ihr Erfahrungsschatz sowie ihre kritische Betrachtung wissenschaftlicher Themen waren für mich jederzeit Vorbild und Stimulus zugleich. Weiterhin danke ich ihr ausdrücklich für die Unterstützung meiner vorübergehenden Auslandsaufenthalte.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Daniela Fliegner, die mir stets half meine Arbeit voranzutreiben. Vielen Dank für den regen Gedankenaustausch, die konstruktive Kritik und die nahezu uneingeschränkte Erreichbarkeit auch außerhalb regulärer Arbeitszeiten und unabhängig von ihrem Aufenthaltsort.

Ich möchte auch Jenny Thomas unendlich danken für die Einführung in die Methodik und das Teilen ihrer herausragenden labortechnischen Fertigkeiten, sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre, die sie stets verbreitete. Sie hat mich in der praktischen Arbeit stets mit Rat und Tat und beeindruckender Zuverlässigkeit unterstützt.

Vielen Dank an Frau Dr. Carola Schubert, die immer hilfsbereit war und für jede Frage ein offenes Ohr hatte. Herzlichsten Dank auch für die Unterstützung meiner Auslandsaufenthalte.

Ich bedanke mich hiermit auch vielfach bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für ihre alltägliche Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich Arne Kühne für die Hilfe bei technischen Fragen jeder Art, Sandra Kunze für das Aufzeigen hilfreicher Kniffe in Software-Angelegenheiten, Alexandra Ellieva, Dr. Elke Dworatzek, Dr. Shokoufeh Mahmoodzadeh und Vanessa Riese für ihre Hilfe bei diversen Laborangelegenheiten herzlich danken.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, meiner Schwester Aminata und meiner Freundin Lois. Ihr habt diese Arbeit mit eurer Unterstützung und Motivation ganz wesentlich vorangetrieben.