

Der Einfluss des Geschlechtshormons Östrogen auf die elektromechanische Kopplung des Herzens

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Ulrike Dreiner
aus
Köln

Bonn 2009

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Physiologie II, Universitätsklinikum Bonn.

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Rainer Meyer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Volker Herzog
Fachnahes Mitglied:	Prof. Dr. Gerhard von der Emde
Fachangrenzendes Mitglied:	Prof. Dr. Christian Grohé

Tag der Promotion: 09.06.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Östrogene	2
1.2	Östrogenrezeptoren.....	3
1.3	Wirkungen von Östrogenen auf das kardiovaskuläre System.....	5
1.4	Die elektromechanische Kopplung von Herzmuskelzellen	6
1.5	Ziele und Fragestellungen der Arbeit	7
2	MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1	Versuchsobjekt	9
2.2	Präparation isolierter Kardiomyozyten	10
2.3	Optische Sarkomerverkürzungsmessung	11
2.3.1	Der Versuchsstand	11
2.3.2	Das Prinzip der Sarkomerverkürzungsmessung	13
2.3.3	Die Versuchsdurchführung	14
2.3.3.1	Anheftung mit Laminin	14
2.3.3.2	Stimulationsprotokoll	15
2.3.3.3	Perfusion	15
2.3.4	Auswertung.....	16
2.3.4.1	Die Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause und im Gleichgewicht.....	16
2.3.4.2	Die Herztreppe nach Stimulationspause	19
2.4	Elektrophysiologische Messungen – Die Patch-clamp-Technik.....	20
2.4.1	Der Versuchsaufbau	20
2.4.2	Untersuchung des L-Typ Calciumstromes	21

2.4.2.1	Rampenförmige Spannungsklemme zur Bestimmung der Membrankapazität.....	21
2.4.2.2	Rechteckförmige Spannungsklemme zur Bestimmung des L-Typ Calciumstromes	21
2.4.2.3	Auswertung und mathematische Aufbereitung der Messdaten	22
2.4.2.3.1	Die Membrankapazität.....	22
2.4.2.3.2	Der L-Typ Calciumstrom.....	22
2.4.3	Die Aktionspotentialmessung	24
2.4.3.1	Ableitung von Aktionspotentialen	24
2.4.3.2	Auswertung.....	24
2.5	Isolierung, Auftrennung und Nachweis von Proteinen	25
2.5.1	Isolation und Trennung von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen aus linken Ventrikel und isolierten Kardiomyozyten	25
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	25
2.5.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.5.4	Western-Blot von SDS-Polyacrylamid-Gelen	26
2.5.5	Immunologischer Nachweis der Proteine	26
2.5.6	Bildliche Verarbeitung der Röntgenfilme.....	27
2.6	Anästhesie.....	27
2.6.1	Inhalationsanästhesie	27
2.6.2	Injektionsnarkose.....	28
2.7	Das Elektrokardiogramm	28
2.7.1	Messung	28
2.7.2	Auswertung	28
2.8	Hämodynamik.....	30
2.8.1	Invasive Blutdruck und Herzdruckmessung	30

2.8.1.1 Herzdruckmessung unter Dobutamin-Stimulation	32
2.9 Organmaße	32
2.9.1 Bestimmung des Herzgewichtes	32
2.9.2 Bestimmung der Tibialänge.....	32
2.10 Statistische Auswertung der Daten.....	32
2.11 Lösungen und Chemikalien.....	33
2.11.1 Präparation und Zellisolierung.....	33
2.11.2 Optische Sarkomerverkürzungsmessung	33
2.11.3 Patch-clamp-Experimente	33
2.11.4 Organentnahme	34
2.11.5 Proteinbestimmung	34
2.11.5.1 Lösungen und Puffer.....	34
2.11.5.2 SDS-Gele	34
2.11.6 Verwendete Chemikalien	35
2.11.7 Antikörper.....	36
2.11.7.1 Erst-Antikörper.....	36
2.11.7.2 Zweit-Antikörper.....	36
2.11.8 Kits	37
3 ERGEBNISSE	39
3.1 Untersuchungen zur Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen	39
3.1.1 Entwicklungsbedingte Veränderung der Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten.....	39
3.1.1.1 Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht	39
3.1.1.2 Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause	43

3.1.2	Untersuchungsergebnisse zum Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Sarkomerverkürzung	46
3.1.2.1	Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht.....	46
3.1.2.2	Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause.....	49
3.1.3	Einfluss des Östrogenrezeptors β auf die Sarkomerverkürzung isolierter weiblicher und männlicher Kardiomyozyten	53
3.1.3.1	Sarkomerverkürzung im Gleichgewichtszustand	53
3.1.3.2	Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause.....	55
3.1.4	Einfluss des Östrogenrezeptors α auf die Sarkomerverkürzung	60
3.1.4.1	Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht.....	60
3.1.4.2	Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause.....	66
3.1.4.3	„Post Rest“ Verkürzung	72
3.2	Einfluss des Östrogenrezeptors α auf den L-Typ Ca^{2+} -Strom.....	74
3.2.1	Strom-Spannungsbeziehung.....	76
3.2.2	Aktivierungskinetik	78
3.2.3	Inaktivierungskinetik	79
3.3	Einfluss des Östrogenrezeptors α auf das Aktionspotential	81
3.4	Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die Expression linksventrikulärer Proteine.....	86
3.4.1	Expression der calciumregulatorischen Proteine sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2a und Phospholamban in männlichen ER β -defizienten und WT Mäusen	86
3.4.2	Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die K^{+} -Kanal 4.3 (Kv 4.3) Expression.....	88
3.4.3	Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die K^{+} -Kanal 1.5 (Kv 1.5) Expression.....	89
3.5	Morphologische Parameter.....	90

3.6	Elektrokardiogramm	92
3.7	Hämodynamik	95
3.7.1	Peripherer Blutdruck	95
3.7.2	Herzfrequenz und linksventrikulärer Druck	98
3.7.2.1	Maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit	99
3.7.3	Herzfrequenz und linksventrikulärer Druck bei Dobutamin-Stimulation ..	100
3.7.3.1	Maximale Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit bei Dobutamin-Stimulation	102
4	DISKUSSION	103
4.1	Myozytäre Kontraktilität isolierter muriner Kardiomyozyten	103
4.1.1	Die Frequenzabhängigkeit der Kontraktilität muriner Kardiomyozyten ..	104
4.1.1.1	Zum Einfluss der Frequenz auf die Ausbildung des Treppenphänomens nach einer Stimulationspause.....	104
4.1.1.2	Die Kraft-Frequenz-Beziehung im Gleichgewichtszustand bei murinen Kardiomyozyten	104
4.1.1.3	Mechanismen der frequenzabhängigen Kontraktilität muriner Kardiomyozyten	107
4.1.2	Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Kontraktilität	109
4.1.3	Entwicklungsbedingte Veränderungen der Kontraktilität	110
4.2	Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzellen	113
4.2.1	Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die Kontraktilität isolierter muriner Kardiomyozyten.....	113
4.2.2	Einfluss des Östrogenrezeptor α auf den L-Typ Calciumstrom	115

4.2.3	Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die SERCA 2a und Phospholamban Expression	118
4.2.4	Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die Kv 4.3 und Kv 1.5 Kanal-Expression.....	120
4.2.5	Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die Aktionspotentialform	122
4.2.5.1	Die Frequenzabhängigkeit der APD ₉₀	125
4.2.6	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der elektromechanischen Kopplung der ER α -defizienten Mäuse	126
4.3	Einfluss des Östrogenrezeptor α auf den kardialen Phänotyp	127
4.3.1	Einfluss des Östrogenrezeptors α auf morphologische Parameter	127
4.3.2	Auswirkungen des Östrogenrezeptor α auf das Elektrokardiogramm.....	129
4.3.3	Einfluss des Östrogenrezeptors α auf die Hämodynamik.....	130
4.3.3.1	Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die Hämodynamik unter Dobutamin-Stimulation.....	133
4.4	Abschließende Betrachtung.....	135
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	137
6	LITERATUR.....	139
7	ANHANG	165
8	ERKLÄRUNG	175
9	DANKSAGUNG.....	177
10	LEBENS LAUF	179
11	VERÖFFENTLICHUNGEN	181

Abkürzungsverzeichnis

a	Skalierungsfaktor für die zweite Boltzmannfunktion
A.	Arterie (Arteria)
AG	Altersgruppe
Akt	Serin/Threonin Proteinkinase
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
APD ₅₀ ; APD ₉₀	Aktionspotentialdauer bis zu 50 bzw. 90% iger Repolarisation
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CICF	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
C _M	Membrankapazität
d	allgemeine Formulierung für den Aktivierungsparameter
d _∞	„Steady State“ Aktivierung
dp/dt _{max}	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
-dp/dt _{min}	maximale Druckabfallgeschwindigkeit
DBP	diastolischer Blutdruck
G _{max}	maximale Leitfähigkeit
E2	17β-Östradiol
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N', N' tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Östrogenrezeptor

ERE	estrogen-responsive-element
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ER α KO	Östrogenrezeptor α -defiziente Maus
ER β KO	Östrogenrezeptor β -defiziente Maus
f	allgemeine Formulierung für den Inaktivierungsparameter
f $_{\infty}$	„Steady State“ Inaktivierung
HEPES	2-(4-Hydroxyethylen)-1-piperaziny) etansulfonsäure
HKL	hochkaliumhaltige Lösung
Hf	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
Hsp 90	Hitzeschockprotein 90
Hz	Hertz
I $_C$	kapazitiver Strom
I $_{Ca,L}$	L-Typ Ca $^{2+}$ -Strom
I $_K$	verzögerter K $^+$ -Auswärtsgleichrichter
I $_{Kr}$	schnelle Komponente des I $_K$
I $_{Ks}$	langsame Komponente des I $_K$
I $_{K\ slow}$	schnell aktivierender und langsam inaktivierender auswärtsgleichrichtender K $^+$ -Strom, nur in der Maus vorkommend
I $_{Kur}$	4-Aminopyridin sensitive Komponente des I $_{K\ slow}$
I $_{Na}$	schneller Natriumeinstrom
I $_{ss}$	langsam aktivierender auswärtsgleichrichtender K $^+$ -Strom
I $_{to}$	transienter K $^+$ -Auswärtsstrom (transient outward current)
I $_{to, fast (f)}$	schnell inaktivierende Komponente des transienten K $^+$ -Auswärtsstroms

$I_{to, slow}$ (s)	langsam inaktivierende Komponente des I_{to}
k	Steigung der Aktivierungskurve
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
Kv	spannungsabhängiger K^+ -Kanal
LBD	Liganden-bindende Domäne
LV	linker Ventrikel (Herz)
LVDP	linksventrikulärer diastolischer Druck
LVG	linksventrikuläres Gewicht (Herz)
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
m	männlich
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MW	Mittelwert
n	Anzahl
OD	optische Dichte
Op	Operation
pAKT	phosphoryliertes Akt
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
QT _c	herzfrequenzkorrigiertes QT-Intervall
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

ROI	Region of Interest
RP	Ruhemembranpotential
RVG	rechtsventrikuläre Gewicht (Herz)
SAECG	Signal-Averaged Electrocardiogram Extension
SBP	systolischer Blutdruck
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SERM	selektiver Östrogenrezeptor Modulator
SERCA	Sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SS ₁	Sarkomerlängenwert in der Nähe der Ruhesarkomerlänge
SS ₂	Sarkomerlängenwert im Gleichgewichtszustand
τ_1	erste Zeitkonstante
τ_2	zweite Zeitkonstante
T1	erste Testklemme
T2	zweite Testklemme
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N',-tetramethyldiamid
TL	Tibiallänge
v/v	Volumenanteil pro Volumen
V _{rev}	Umkehrpotential
V _{1/2}	Potential der halbmaximalen Aktivierung
w	weiblich

WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
$[X]_i$	intrazelluläre Konzentration der Ionensorte X
$[X]_a$	extrazelluläre Konzentration der Ionensorte X

1 Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen waren laut statistischem Bundesamt die Todesursache Nr. 1 im Jahr 2007 (www.destatis.de, zuletzt am 01.02.2009) und stellen damit ein erhebliches gesellschaftliches Problem dar.

Epidemiologische Studien weisen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Mortalität und Inzidenz koronarer Herzkrankheiten nach. Frauen vor den Wechseljahren haben ein signifikant geringeres Mortalitätsrisiko für kardiovaskuläre Erkrankungen als Männer im gleichen Alter (KANNEL et al., 1976; GARDIN et al., 1995). Schon 1982 demonstrierten HINKLE & THALER einen Einfluss des Geschlechts auf die Inzidenz des plötzlichen Herztodes. Weitere Untersuchungen untermauern, dass der plötzliche Herztod in seiner Geschlechtsverteilung eine erhebliche Prädisposition bzgl. der männlichen Population aufweist (70:30%, KANNEL et al., 1998). Trotz der unterschiedlichen Geschlechtsverteilung trifft der plötzliche Herztod nicht nur Patienten sondern auch Patientinnen z.B. insgesamt 400.000 Todesfälle pro Jahr in den USA (KANNEL et al., 1998). Im Vordergrund der zugrunde liegenden Mechanismen stehen maligne Herzrhythmusstörungen, die vornehmlich als ventrikuläre Tachykardien oder Kammerflimmern definiert werden (ALBERT et al., 2003; PEARSON et al., 2002). Auch die hypertensive Herzkrankheit ist durch erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede gekennzeichnet. Die hypertensive Herzkrankheit geht mit einer gestörten systolischen linksventrikulären Funktion einher. Sowohl die Ejektionsfraktion als auch das „fractional shortening“ ist bei Frauen mit Bluthochdruck signifikant höher als bei Männern (GERDTS et al., 2001). Diese Befunde waren unabhängig vom Body-Mass-Index, Größe und linksventrikulären Stress. Dies belegt, dass die linksventrikuläre systolische Funktion bei hypertensiven Herzkrankheiten deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist.

Die pathophysiologischen Grundlagen geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Entwicklung kardialer Erkrankungen sind bisher nur ungenügend geklärt. Geschlechtshormone wie Testosteron und Östrogen sind für die Ausbildung geschlechtsspezifischer Eigenheiten verantwortlich. Beide kommen sowohl in weiblichen als auch männlichen Organismen vor. Besonders dem Geschlechtshormon Östrogen ist bisher eine Rolle bei Herz-Kreislaufkrankungen zugeschrieben worden. Neuere Untersuchungen belegen,

dass Östrogen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie sowohl bei nicht-ischämischen als auch ischämischen kardialen Erkrankungen spielt (VAN EICKELS et al., 2001; BABIKER et al., 2002; VAN EICKELS et al., 2003). Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit u.a. der Einfluss des Östrogens auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle bestimmt werden.

1.1 Östrogene

Östrogene gehören zu der Gruppe der Steroidhormone. Die Vorstufe der Steroidhormone und damit auch des Östrogens ist das Cholesterin. Zwischenstufen in der Biosynthese der Östrogene sind Androstendion und Testosteron (BERG et al., 2007). Östrogene werden hauptsächlich im Ovar und Plazenta synthetisiert, in geringen Mengen auch in der Nebennierenrinde und in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens. Das wichtigste und physiologisch am stärksten wirksame Östrogen ist das 17β -Östradiol (E2, Abbildung 1.1).

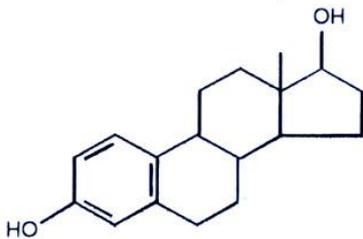


Abbildung 1.1: Strukturformel von 17β -Östradiol

Die Sekretionsrate von E2 beträgt bei Frauen abhängig von der Zyklusphase 50-400 $\mu\text{g}/\text{Tag}$. Mit zunehmendem Alter sinkt die Sekretionsrate. Frauen in der Postmenopause produzieren 5-25 $\mu\text{g}/\text{Tag}$. Der Serumspiegel liegt bei Frauen präovulatorisch bei 250-500 pg/ml . Postmenopausal fällt der E2 Spiegel auf minimale Werte (<20 pg/ml) ab (GRUBER et al., 2002). Die Sekretionsrate von E2 bei älteren Männern beträgt 25-40 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ und der Serumspiegel liegt bei 200-300 pg/ml (VERMEULEN et al., 2002). Die Wirkungen von Östrogenen sind vielfältig. Sie regulieren Genexpression, Wachstum, zelluläre Differenzierung und die Funktion unterschiedlicher Zielgewebe. Hierzu gehören u.a. neben den Geweben der Fortpflanzungsorgane die Brust, der Knochenapparat, das zentrale Nervensystem, die Leber und das kardiovaskuläre System (COUSE & KORACH,

1999; GUSTAFSSON, 1999; GRUBER et al., 2002; MENDELSON & KARAS, 2005). Des Weiteren beeinflussen Östrogene pathologische Prozesse von hormonabhängigen Erkrankungen wie Brust-, Gebärmutter- und Eierstockkrebs sowie Osteoporose (COUSE & KORACH, 1999). Die amphiphilen Eigenschaften des Hormons ermöglichen die Diffusion durch die Plasmamembran der Zelle. Dort binden sie an intrazelluläre Steroidhormon-Rezeptoren, die nach Ligandenbindung u.a. die Gen-Expression beeinflussen (KLEINIG & MAIER, 1999).

1.2 Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren (ER) gehören der Superfamilie der nukleären Rezeptoren an. Sie wirken als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren. Die ER Proteine lassen sich in sechs funktionelle Domänen einteilen (MANGELSDORF et al., 1995, Abbildung 1.2). Die N-terminale Domäne (A/B-Domäne) besitzt eine Liganden-unabhängige transaktivierende Funktion (AF-1), die durch Phosphorylierung gesteigert werden kann (KATO et al., 1995; BUNONE et al., 1996). Die DNA bindende C-Domäne ist die am meisten konservierte Region innerhalb der Östrogenrezeptoren. Sie besitzt eine Kernregion von 66 Aminosäuren, die zwei Zinkfinger motive enthält (HIHI & WAHLI, 1999). Diese Region ist beteiligt an der spezifischen DNA Bindung (P-Box) und Dimerisierung (D-Box, KUMAR & CHAMBON, 1988). An die Liganden-bindende Domäne (LBD, E-Domäne) in der auch die transkriptionsaktivierende Region AF-2 lokalisiert ist, schließt sich die variable F-Region am Carboxyl-Terminus an. Die LBD enthält zusätzlich Regionen, die für die Rezeptor-Dimerisierung und für die nukleäre Translokation von Bedeutung sind (YLIKOMI et al., 1992). Durch Chaperone wie das Hsp90 werden die Rezeptoren in einem inaktiven, für den Liganden aber bindungsbereiten Zustand gehalten (PRATT & WELSH, 1994). Die Bindung des Liganden führt zu einer Dissoziation der Chaperone und einer Konformationsänderung gefolgt von einer Freilegung der DNA bindenden Domäne. Dies ermöglicht dem Rezeptor die Dimerisierung und die nukleäre Translokation (SIMONCINI et al., 2004). Die Dimere erkennen und binden oberhalb des Transkriptionsstarts einen pallindromischen DNA Abschnitt von 13 Basenpaaren Länge (AGG-TCANNNTGACCT), das so genannte estrogen-responsive-element (ERE, KUMAR & CHAMBON, 1988; UMESONO & EVANS, 1989; GRONEMEYER, 1991). Im Nukleus kommt es zur Bildung eines Transkriptionskomplexes. Hierzu assoziieren sich Coaktivatoren und

andere Transkriptionsfaktoren mit den Rezeptoren (BANIAHMAD et al., 1995; RACHEZ & FREEDMANN, 2001).

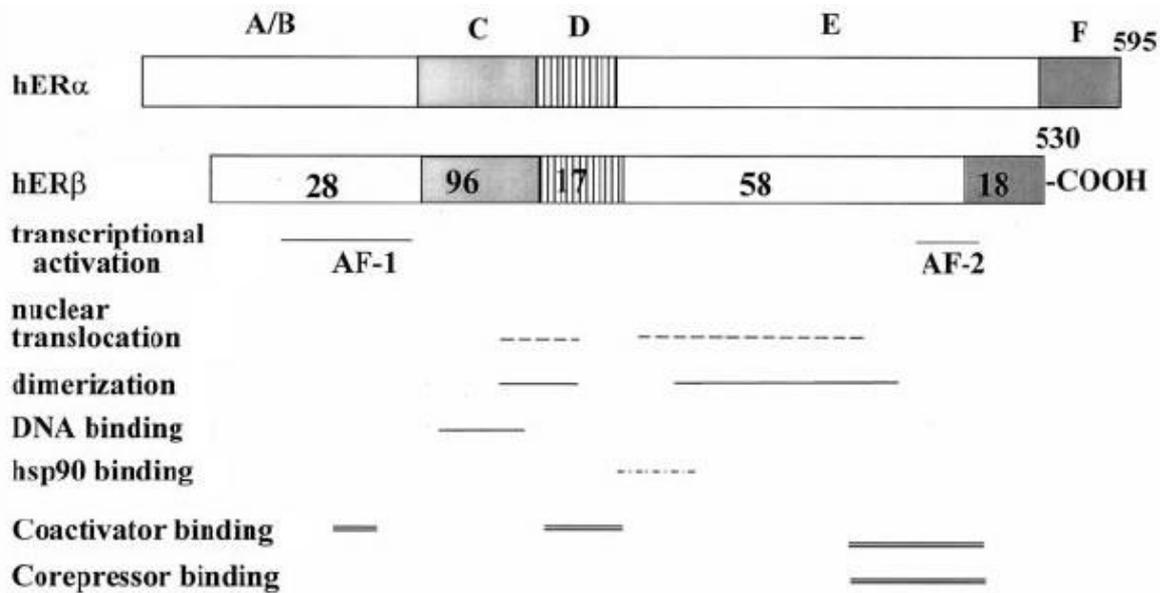


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der allgemeinen und funktionellen Domänen des humanen (h) ER α und ER β .

Die Domänen der Rezeptoren werden angezeigt, sowie die verantwortlichen Regionen für die Transkriptionsaktivierung (AF-1 und AF-2), nukleäre Translokation, Dimerisierung, DNA-Bindung, hsp90-Bindung und die Interaktion mit Coaktivatoren und Corepressoren. Die prozentuale Homologie der Aminosäuren zwischen den Regionen A-F wird durch die Nummern angezeigt (KLINGE, 2000).

Es gibt zwei Arten von Östrogenrezeptoren: den klassischen Östrogenrezeptor α (595 Aminosäuren, 66 kDa, GREEN et al., 1986; WALTER et al., 1985) und den später entdeckten ER β (485 Aminosäuren, 54,3 kDa, KUIPER et al., 1996; KATZENELLENBOGEN & KORACH 1997). Beide Isotypen des ERs werden von unterschiedlichen Genen auf verschiedenen Chromosomen codiert (SLUYSER et al., 1988; ENMARK et al., 1997; TREMBLAY et al., 1997). Der ER β der Maus besitzt eine 97%ige Homologie in der DNA Bindungsdomäne und eine 60%ige Homologie in der Liganden-Bindungsdomäne (TREMBLAY et al., 1997) zum ER α der Maus. Grundlegende Unterschiede bestehen im Bezug auf das Expressionsmuster und in der jeweiligen transkriptionalen Aktivität (MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003). Der ER α wird hauptsächlich im Uterus, in der Leber, Niere und Herz exprimiert, während der ER β sich hauptsächlich in Ovarien, Prostata, Lunge, Verdauungstrakt, blutbildendes System und zentralen Nervensystem befindet (MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003). In Zellen, in denen ER α und ER β coexprimiert werden, ist neben der Bildung von ER α - und ER β -Homodimeren die Bildung von

ER α /ER β -Heterodimeren möglich (ENMARK & GUSTAFSSON, 1999; MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003).

Neben diesen genomischen Wirkungen von Östrogen sind schnelle, nicht-genomische Effekte bekannt. ER α und ER β befinden sich auch in den Caveolae der Plasmamembranen. E2 induziert hierüber eine Reihe von Signalkaskaden, u.a. die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK, GRUBER et al., 2002; MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003). Darüber hinaus wurden direkte Wirkungen des E2/ER α Komplexes im Cytosol nachgewiesen. Hierzu zählt die Rekrutierung von membranständigen und cytosolisch lokalisierten Signalkomponenten. Dazu gehören die sekundären Botenstoffe Ca²⁺ und NO, die Rezeptortyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Proteinkinasen (z.B. Phosphatidylinositol-3-Kinase, AKT, MAPK, die Tyrosinkinase SRC und die Proteinkinasen A und C, LIAO, 2003).

1.3 Wirkungen von Östrogenen auf das kardiovaskuläre System

ER α und ER β konnten in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten nachgewiesen werden (GROHÉ et al., 1997; MEYER et al., 1998). Beide Isoformen werden sowohl im Herzen von Menschen (BRANDENBERGER et al., 1997) als auch im Herzen von Nagetieren exprimiert (GROHÉ et al., 1997). Auch in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäße werden beide ERs exprimiert (MENDELSON & KARAS, 1999). Sowohl genomische als auch nicht-genomische Wirkungen von Östrogenen auf das kardiovaskuläre System sind bekannt. Östrogen besitzt eine vasodilatierende Wirkung. Die akute Applikation von Östrogen dilatiert die Blutgefäße, vermittelt über eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS, CHEN et al., 1999). Nichtphysiologische Konzentrationen von Östrogen reduzierten die Kontraktilität von humanen Herztrabekeln, ventrikulären Papillarmuskeln (SITZLER et al., 1996) und von isolierten Kardiomyozyten (JIANG et al., 1992). Dies ist möglicherweise erklärbar durch eine antagonistische Wirkung des Östrogens auf den L-Typ Calciumstrom (GROHÉ et al., 1996; MEYER et al., 1998). Zur genomischen Wirkung von Östrogen zählt u.a. die Regulation der Genexpression der NO Synthase im Myokard. Dies führt zu einer Hochregulation von eNOS und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Kardiomyozyten (NUEDLING et al., 1999). Als weiteres Zielgen von Östrogen im Myokard konnte das Connexin 43 (GROHÉ et al., 1997) identifiziert werden. Des Weiteren beeinflusst Östrogen die Expression von Proteinen, die für die

elektromechanische Kopplung relevant sind. Eine ER α -Defizienz erhöhte in männlichen Mäusen die L-Typ Ca²⁺-Kanal mRNA- und Proteinlevel (JOHNSON et al., 1997). Außerdem ist eine östrogenvermittelte Herunterregulation der Expression von Kaliumkanälen im Kaninchenherzen (I_{Ks}) bekannt (DRICI et al., 1996).

1.4 Die elektromechanische Kopplung von Herzmuskelzellen

Die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle ist der Vorgang der Umsetzung eines Aktionspotentials (APs) in die Interaktion der kontraktilen Proteine. Essentiell für die stattfindende kardiale elektrische Aktivität und die Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten ist Ca²⁺, ein ubiquitärer „second messenger“ (BERS, 2001). Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration [Ca²⁺]_i führt zur Kontraktion der Herzmuskelzelle.

Der Ablauf der elektromechanischen Kopplung der Herzmuskelzelle sei im folgendem kurz skizziert: Die Depolarisation der Zelle (Aufstrich des APs) resultiert aus der Aktivierung Tetrodotoxin-sensitiver Na²⁺-Kanäle. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen. Der größte Calciumeinstrom fließt durch den spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanal. Der Strom durch den T-Typ Ca²⁺-Kanal ist sehr gering oder abwesend in Ventrikelformozyten. Somit ist der Beitrag zur [Ca²⁺]_i über diesen Kanal fast zu vernachlässigen (BERS, 2001). Der Calciumeinwärtsstrom triggert primär die Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung (CICF) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Nur in geringem Ausmaße aktivieren die einwärtsströmenden Ca²⁺-Ionen direkt den kontraktilen Apparat. Die Kombination aus Calciumeinstrom und CICF erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration, so dass Calcium an das Myofilamentprotein Troponin C bindet (BERS, 2000). Die Repolarisation der Zelle erfolgt durch verzögert einsetzende K⁺-Ströme und eine zunehmende Inaktivierung der Ca²⁺-Kanäle. Dadurch erreicht die Myozyte wieder ihr Ruhemembranpotential, das nahezu dem Kaliumgleichgewichtspotential entspricht. Für die Relaxation muss die [Ca²⁺]_i wieder sinken. Calcium kann so wieder vom Troponin C dissoziieren. Hierzu stehen vier Transportmechanismen der Zelle zur Verfügung: 1. SR Ca²⁺-ATPase, 2. der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in der Plasmamembran, 3. Ca²⁺-ATPase im Sarkolemm und 4. der mitochondriale Ca²⁺-Uniport. In der Maus ist mit 90,3 % Beitrag die SR Ca²⁺-ATPase das wichtigste Transportsystem zur Entfernung des Calciums aus dem Cytosol. Der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher stellt mit 9,2 % das zweit effektivste System dar. Die langsamen Transportsysteme,

die Ca^{2+} -ATPase und der mitochondriale Ca^{2+} -Uniport, spielen mit 0,5 % nur eine untergeordnete Rolle (LI et al., 1998).

Im Gleichgewichtszustand sollte die aus der Zelle entfernte Calciummenge während der Relaxation der einströmenden Calciummenge entsprechen. Ansonsten würde die Zelle Calcium verlieren oder dazu gewinnen. Findet jedoch während eines Kontraktionszyklus ein Netto-Influx oder –Efflux von Ca^{2+} über das Sarkolemm statt, ändert sich die $[\text{Ca}^{2+}]$ im SR. Dies führt zu einer verminderten oder vermehrten CICF und damit zu einer positiven bzw. negativen Inotropie. Ursachen hierfür könnten z.B. ein veränderter L-Typ Calciumstrom ($I_{\text{Ca,L}}$) sein. Somit könnte der von JOHNSON et al. (1997) beobachtete erhöhte $I_{\text{Ca,L}}$ in Kardiomyozyten von männlichen $\text{ER}\alpha$ defizienten Mäusen möglicherweise eine positiven Inotropie verursachen.

1.5 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Einflüsse des $\text{ER}\alpha$ und $\text{ER}\beta$ auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle zu identifizieren. Voruntersuchungen sollen eventuelle Einflüsse der extrazellulären Calciumkonzentration und des Alters der Versuchstiere auf die Sarkomerverkürzung ausschließen. Außerdem sollen geschlechtsspezifische Unterschiede im Rahmen der elektromechanischen Kopplung analysiert werden. Des Weiteren sollen die auf zellulärer Ebene gewonnenen Ergebnisse mit möglichen Änderungen in der Hämodynamik und im Elektrokardiogramm (EKG) korreliert werden. Hierbei steht im Zentrum des Interesses die Charakterisierung des kardialen Phänotyps der weiblichen und männlichen Östrogenrezeptor α defizienten ($\text{ER}\alpha\text{KO}$) Maus.

Folgende Fragestellungen stehen im Mittelpunkt der Untersuchung:

1. Übt das Alter der Tiere einen Einfluss auf die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten aus?
2. Ist die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängig?
3. Beeinflussen $\text{ER}\alpha$ und $\text{ER}\beta$ die elektromechanische Kopplung weiblicher und männlicher Kardiomyozyten?

Liegen Veränderungen der Sarkomerverkürzungen vor?

Wenn ja, was ist die Erklärung hierfür?

Ist der $I_{Ca,L}$ verändert?

Ergeben sich ER-vermittelte Unterschiede in der Expression von Kaliumkanälen?

Ist die Form des APs verändert?

Liegen ER-vermittelte Unterschiede in der Expression der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2a) vor?

4. Wirken sich eventuelle Unterschiede in der elektromechanischen Kopplung in-vivo aus?

Sind geschlechtsspezifische und ER-vermittelte Unterschiede in der Hämodynamik zu erkennen?

Sind Veränderungen des EKGs beobachtbar?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsobjekt

Der Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf das kardiovaskuläre System wurde mithilfe von Östrogenrezeptor α (ER α KO, DUPONT et al., 2000) und β (ER β KO, KREGG et al., 1998) defizienten Mäusen analysiert. Als Kontrolle dienten die jeweils dazugehörigen homozygoten Wildtypiere (ER α +/+, ER β +/+, auch im Folgenden als WT bezeichnet). Die Untersuchungen erfolgten an isolierten Kardiomyozyten und am Ganztier adulter (>100 Tage) weiblicher und männlicher Tiere.

Die Festlegung der Altersklasse resultierte aus Ergebnissen einer Altersstudie an C57BL/6 Mäusen (TIEMANN et al., 2003). Um den Einfluss entwicklungsbedingter Veränderungen der Tiere auf die Sarkomerverkürzung zu bestimmen, wurde die Kontraktibilität isolierter Kardiomyozyten von weiblichen C57BL/6 Mäusen der folgenden Altersgruppen (AG) untersucht:

- AG 1: 21 \pm 1 Tag
- AG 2: 93 \pm 4 Tage
- AG 3: 169 \pm 4 Tage
- AG 4: 362 \pm 2 Tage

Die Sarkomerverkürzungsmessungen zur Ermittlung des Einflusses der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Kontraktibilität der Herzmuskelzelle wurden an isolierten Kardiomyozyten weiblicher C57BL/6 Mäuse vorgenommen.

Die Östrogenrezeptor-defizienten Mäuse und die dazugehörigen Wildtypiere wurden vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Bonn, gezüchtet, genotypisiert und zur Verfügung gestellt. Aufgrund der Infertilität der weiblichen ER α KO Mäuse und der verminderten Fertilität der männlichen ER α KO Tiere (DUPONT et al., 2000) erfolgte die Zucht mit heterozygoten Tieren (ER α +/-). Mittels PCR von Schwanzspitzen-DNA erfolgte die Genotypisierung. Der genetische Hintergrund der

Östrogenrezeptor-Knockout und –Wildtypiere ist C57BL/6Jx129/SV.

Die verwendeten C57BL/6 Tieren stammten aus der institutseigenen Zucht, dem zentralen Tierhaus des Universitätsklinikums Bonn oder von Charles River (Sulzfeld, Deutschland).

2.2 Präparation isolierter Kardiomyozyten

Die enzymatische Isolierung der Ventrikelmyozyten erfolgte nach der von ACHENBACH et al. (1985) vorgeschlagenen und von MEYER (1989) modifizierten Methode. Daher wird das Isolationsverfahren hier nur kurz skizziert. Die hierzu verwendeten Lösungen sind unter 2.11.1 aufgeführt.

Nach Tötung des Tieres mittels Genickbruch wurde das Herz schnellst möglichst entnommen und in Ca^{2+} -freie Tyrodelösung überführt. Nachdem das Herz von Perikard und Bindegewebsresten befreit war, wurde es retrograd nach LANGENDORFF perfundiert (Abbildung 2.1). Auf 37°C erwärmte und mit O_2 begaste Lösungen durchspülten das Herz nach folgendem Protokoll: Fünf Minuten Ca^{2+} -freie Tyrodelösung, fünf Minuten hochkaliumhaltige Lösung (HKL), sechs bis zehn Minuten HKL mit 0,4 mg/ml Trypsin, zwei bis drei Minuten HKL und anschließend 10 bis 15 Minuten HKL mit 0,375 mg/ml Kollagenase (Typ L). Nach Stoppen der Perfusion schlossen sich weitere Arbeitsschritte an: Überführung und mechanische Zerkleinerung des Ventrikels in Präparationstyrode; Filtrierung der Zellsuspension durch eine Nylon-Gaze (Maschenweite: 125 μM); Zentrifugieren der von groben Gewebsresten gereinigten Zellsuspension (niedrige Drehzahl, ca. 30 s); Abpipettieren des Überstandes; Resuspendieren der Zellen in Präparationstyrode; 10 minütige Sedimentation bei 37°C ; nochmaliges Abpipettieren des Überstandes und Resuspendieren mit Präparationstyrode; Überführen der Zellsuspension in einen Schliff-Erlenmeyerkolben mit anschließender O_2 Begasung. Bis zum Experimentbeginn (maximal fünf Stunden) lagerten die Zellen in diesem Zustand bei Raumtemperatur. Die Ausbeute an stäbchenförmigen Myozyten betrug durchschnittlich 40-60%.

Für die Isolation von Kardiomyozyten junger Tiere im Alter von 21 ± 1 Tagen musste sowohl die Enzymkonzentration als auch die Durchlaufzeit der Enzyme halbiert werden.

Die vitalen, isolierten Kardiomyozyten wurden anschließend elektrophysiologisch oder mittels eines optischen Messverfahrens untersucht.

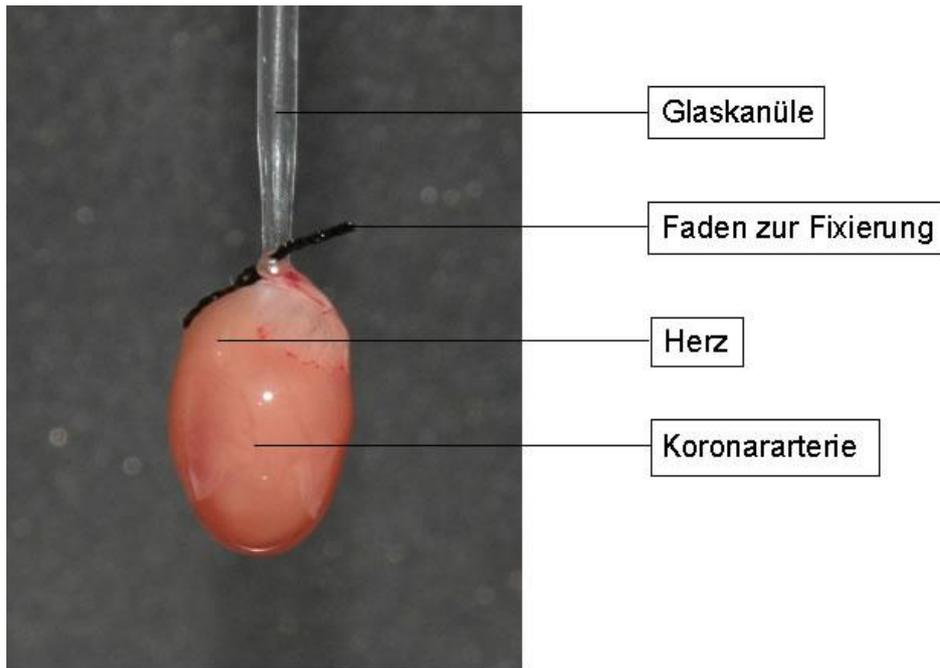


Abbildung 2.1: *Perfusion nach LANGENDORFF*

Eine Glaskanüle wurde über die Aorta in den linken Ventrikel eingeführt und mithilfe eines Fadens fixiert. Das Herz wurde mit den Isolationslösungen retrograd nach LANGENDORFF perfundiert.

2.3 Optische Sarkomerverkürzungsmessung

2.3.1 Der Versuchsstand

Der Versuchsstand (Abbildung 2.2) bestand im Wesentlichen aus vier Komponenten:

(1) *Inverses Mikroskop* (Axiovert S 100 TV; Zeiss, Jena, Deutschland), installiert auf einem schwingungsgedämpften Tisch mit Faraday Käfig (Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes der Universität Bonn). An einem zweiten Strahlengang war eine spezielle Videokamera angeschlossen, auf dem beweglichen Objektisch war eine Versuchskammer montiert.

(2) *Versuchskammer und Perfusion*. Bei der Versuchskammer handelte es sich um eine Acrylkammer, nach oben offen, der Boden bestand aus einem dünnen Deckglas (Stärke 0). Ein Zulauf und ein Ablauf dienten der kontinuierlichen Perfusion. Die Konstanthaltung der Versuchstemperatur auf $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ resultierte aus einem in den Kammerboden eingelassenen elektrischen Temperaturfühler, einem getrennten Wasserdurchlauf und einer Wärmekammer im Perfusionssystem. Ein Heizgerät des Typs Julabo F 10 (Julabo

Inc., Allentown, USA), verbunden mit dem elektrischen Temperaturfühler regulierte die Temperatur. Der Zulauf der Lösungen erfolgte über Perfusorspritzen (B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland), angebracht in einer Lochleiste mit 30 cm Höhenunterschied zur Versuchskammer. Der hierdurch aufgebaute hydrostatische Druck sorgte für eine gleichmäßige Perfusion. Tropfenzähler (Exadrop, B. Braun, Medical AG) bestimmten die Einflussgeschwindigkeit in die Kammer (70 ml/h). Eine Vakuumpumpe (Hyflo, Herts, England), unter Zwischenschaltung einer Saugflasche, saugte die Lösung über eine Glaskapillare aus der Versuchskammer.

(3) *Externe Stimulationsvorrichtung*, setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: Einer Reizelektrode aus zwei parallel angeordneten Golddrähten befestigt an einem Mikromanipulator, einem Reizgerät (SD 9, Grass, Quincy, MA, USA), einem DC Verstärker (Werkstatt des Physiologischen Institutes), einem Interface (Digidata 1200, Axon Instruments, Union City, CA, USA) und einem PC. Mithilfe der Software Programme Pclamp, Clampfit (Axon Instruments, Union City, CA, USA) und Excel (MS Excel 2000, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) wurde das verwendete Reizmuster programmiert. PC gesteuert, unter Zwischenschaltung der aufgeführten Komponenten, applizierte die Reizelektrode die Reize als Spannungssprünge in die Versuchskammer. Das Reizgerät selbst diente nur zur Einstellung des adäquaten Stimulus. Verwendet wurde ein biphasischer Rechteckpuls mit einer Reizdauer von 0,4 ms und einer Spannung von 30 Volt. Zusätzlich übertrug eine weitere Verbindung vom DC Verstärker zu einem Fluorescence Systeme Interface (IonOptix, Milton, MA, USA) das Reizmuster auf die Sarkomerverkürzungsmesssoftware.

(4) *IonOptix Anlage*, bestand aus der IonOptixMyocam CCD100M (IonOptix, Milton, MA, USA) Videokamera, dem dazugehörigen Regelgerät und einem Fluorescence Systeme Interface. Diese spezielle Videokamera war am zweiten Strahlengang montiert. Sie stellte die 40fach vergrößerten Kardiomyozyten (Objektiv: Zeiss, 40x) mit einer Bildfrequenz von 240 Hertz (Hz) dar. Die dazugehörige Software (IonWizard Sarcomer Length Aquisition Software, IonOptix) registrierte die Sarkomerlängen der zu untersuchenden Kardiomyozyten (Messprinzip vgl. Kapitel 2.3.2).

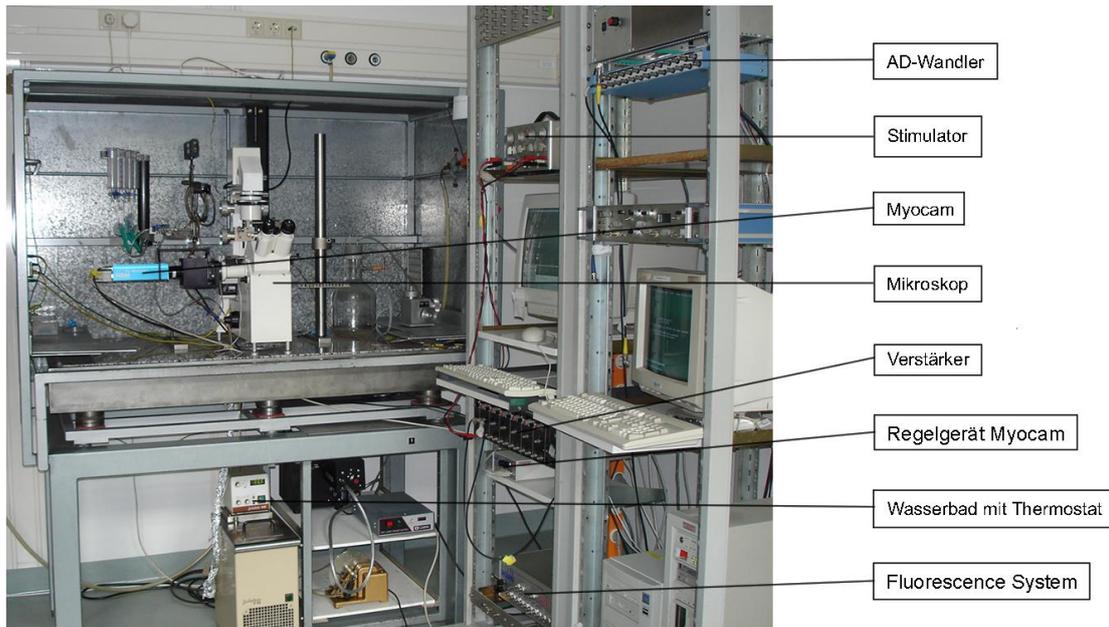


Abbildung 2.2: Versuchsstand der Sarkomerverkürzungsmessung

2.3.2 Das Prinzip der Sarkomerverkürzungsmessung

Das unter Kapitel 2.3.1 genannte Video Imaging System maß die Kontraktilität der Kardiomyozyten in Form der Sarkomerverkürzung. Sarkomere stellen die kleinste funktionelle Einheit des Muskels dar. Die regelmäßigen Überlappungen der Aktin- und Myosinfilamente führen zur charakteristischen Querstreifung, die im Lichtmikroskop als Hell-Dunkel-Bänderung zu erkennen waren. Diese optischen Eigenschaften nutzte die Aufzeichnungssoftware. Um valide Ergebnisse zu sichern, musste die Querstreifung vertikal zur Längsachse des Messfensters ausgerichtet sein. Analysiert wurden die Sarkomere in einer benutzerdefinierten Region (Region of Interest, ROI, Abbildung 2.3). Um genaueste Messergebnisse zu erhalten, sollte diese etwa 50-60% der Zelloberfläche enthalten (LIM et al., 2001). Jedem Bildpixel wurde ein Helligkeitswert zwischen 0 (schwarz) und 256 (weiß) zugeordnet. Hieraus ergab sich eine Helligkeitskurve, die aufgrund der regelmäßigen Anordnung von A- und I-Banden eine sinusoidale Form besaß. Eine einzige Periode der Sinuskurve repräsentierte die Länge eines Sarkomers. Um die gemittelte Frequenz der Sinuskurven zu erhalten, die eine Umwandlung in die absolute Sarkomerlänge erlaubt, wurde online eine Fast Fourier Transformation durchgeführt (Algorithmus s. Documentation, Fluorescence and Contractility System, IonOptix). Das erhaltene Powerspektrum war das Ergebnis der Fast Fourier Transformation. Aus der Lage des Gipfels des Power

Spektrums war die absolute Sarkomerlänge bestimmbar. Eine Sarkomerverkürzung führte zur Verschiebung des Powerspektrums (Documentation, Fluorescence and Contractility System, IonOptix; LIM et al., 2001).

Die Online-Analyse ermöglichte es, den zeitlichen Verlauf der Sarkomerlängenänderung darzustellen. Eine Verkürzung der Sarkomerlänge zeigt sich als Ablenkung nach unten (Abbildung 2.3).

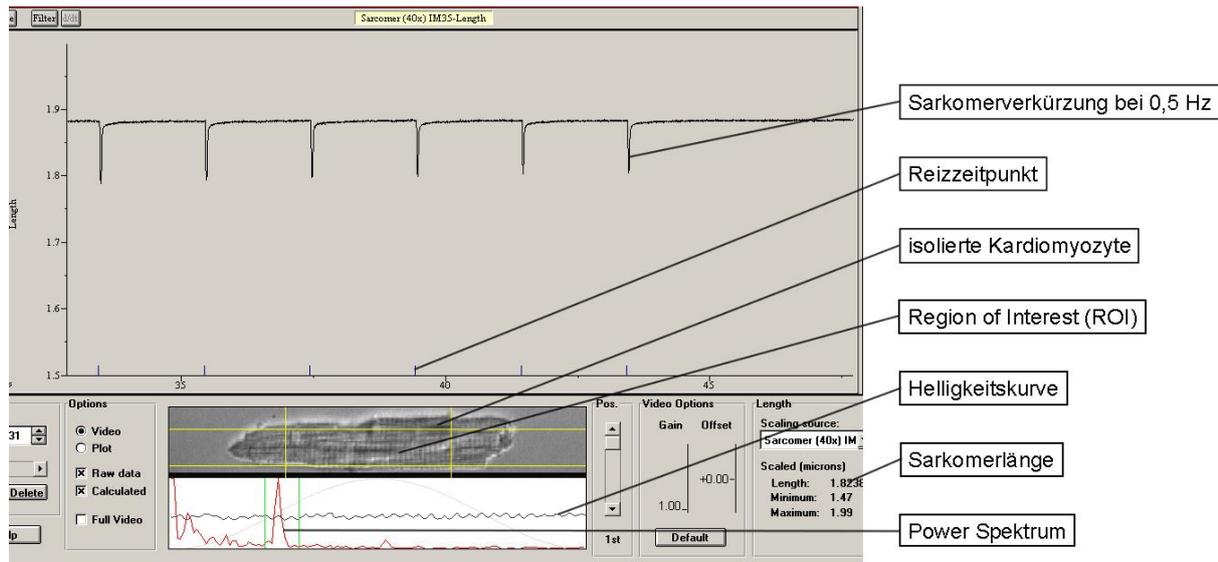


Abbildung 2.3: *Messfensters der Sarkomerverkürzungsmessung*
Dargestellt ist ein Ausschnitt der Sarkomerverkürzungsmessung an einer murinen Kardiomyozyte bei 0,5 Hz Stimulationsfrequenz.

Aufgrund des Messprinzips eigneten sich nur vitale Zellen mit ausgeprägter Querstreifung.

2.3.3 Die Versuchsdurchführung

2.3.3.1 Anheftung mit Laminin

Die konstante Perfusion während der Messung wie auch die Kontraktion der Kardiomyozyte selbst führt zur Dislokation der Zelle in der Versuchskammer. Eine konstante Einstellung der ROI während des gesamten Untersuchungszeitraumes wäre somit ohne Anheftung der Zellen nicht gewährleistet gewesen. Die Fixation der Herzmuskelzellen stellte also eine notwendige Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse dar. Laminin, ein Glykoprotein, heftete die Zellen an den Glasboden der Kammer an. Bei Laminin handelt es sich um ein adhäsives Protein der extrazellulären Matrix, d.h. es besitzt Bindungs-

sequenzen für bestimmte Rezeptoren in der Plasmamembran. Dieses kreuzförmige heterotrimere Protein ($M_r = 850,000$) setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen (A, B_1 und B_2). Ein Pentapeptid der B_1 Kette mit der Aminosäuresequenz Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg bindet mit einer hohen Affinität (K_d ca. 2 nM/l) an den 67 kDa Rezeptor der Ventrikelmyozyte (LESOT et al., 1983). Dieser Rezeptor ist ein Transmembranprotein, welches intrazellulär mit dem Cytoskelett und Aktin in Verbindung steht (TIMPL et al., 1979; KLEINMANN et al., 1985; MARTIN & TIMPL, 1987; KLEINMANN et al., 1987).

Das Laminin wurde in der Messtyrode gelöst und in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ in die Kammer eingebracht. Nach sechsminütiger Vorinkubation folgte das Auswaschen mithilfe der Perfusion. Darauf folgend inkubierten einige Tropfen Zellsuspension weitere sechs Minuten in der Kammer. Vitale Zellen sanken ab und hefteten sich mithilfe des Laminins an das Deckglas der Kammer an. Nach der Inkubation führte die einsetzende Perfusion und Absaugung zu einer Aufreinigung der lebenden Herzmuskelzellen. Abgerundete, langsam absinkende und bereits abgestorbene Zellen wurden mit abgesaugt.

2.3.3.2 Stimulationsprotokoll

Nach Anheftung der Zellen erfolgte die eigentliche Messung. Das in Form einer Feldstimulation auf die Zelle applizierte Reizmuster enthielt Frequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz in folgender Reihenfolge: 0,5, 10, 1, 8, 2, 6 und 4 Hz (jeweils zwanzig Reize). Eine abwechselnde Reizung mit einer niedrigen und hohen Stimulationsrate vermied eine Frequenzadaptation der Zelle. Eine dreißig Sekunden dauernde Pause trennte die einzelnen Reizabfolgen.

2.3.3.3 Perfusion

Die Sarkomerverkürzungsmessungen an isolierten Kardiomyozyten fanden unter Verwendung der Standard Messtyrode (Kapitel 2.11.2) mit einer Calciumkonzentration von 1,8 mM (Tropfgeschwindigkeit der Perfusion von 70 ml/h) statt.

Die Kontraktion einer Herzmuskelzelle ist nicht nur von der intrazellulären sondern auch entscheidend von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängig. Messungen mit Messtyroden unterschiedlicher Calciumkonzentrationen (in mM: 0,9; 1,8; 3,6; 7,2) dienten zur Bestimmung des Einflusses der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Sarkomerverkürzung. Die Durchführung der Experimente fand nach folgendem Schema

statt: Messung mit Standard Messtyrode, anschließend jeweils zwei Minuten Lösungswechsel (zunächst auf 0,9, dann 3,6 und 7,2 mM) bei unveränderter Tropfgeschwindigkeit der Perfusion (70ml/h) mit nachfolgender Messung. Diese Methode ermöglichte es, eine einzige Zelle bei vier verschiedenen Calciumkonzentrationen zu messen.

2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der gewonnenen Daten analysiert drei Aspekte: Die Verkürzungsantwort der Zelle nach Stimulationspause („Post Rest“ Verkürzung, Kapitel 2.3.4.1), die Verkürzung im Gleichgewicht der jeweiligen Frequenz („Steady State“ Verkürzung, Kapitel 2.3.4.1) und das Verhalten der Zelle auf dem Weg zum Gleichgewicht (Kapitel 2.3.4.2).

2.3.4.1 Die Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause und im Gleichgewicht

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der IonOptix Auswertungssoftware. Sie ermöglichte es, jede Verkürzung einzeln oder auch mehrere gleichzeitig auszuwerten. Für die Auswertung der Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause wurde jeweils die erste Verkürzung einer Reizabfolge betrachtet, zur Evaluierung der Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht die Reizantwort 16-20 (Abbildung 2.).

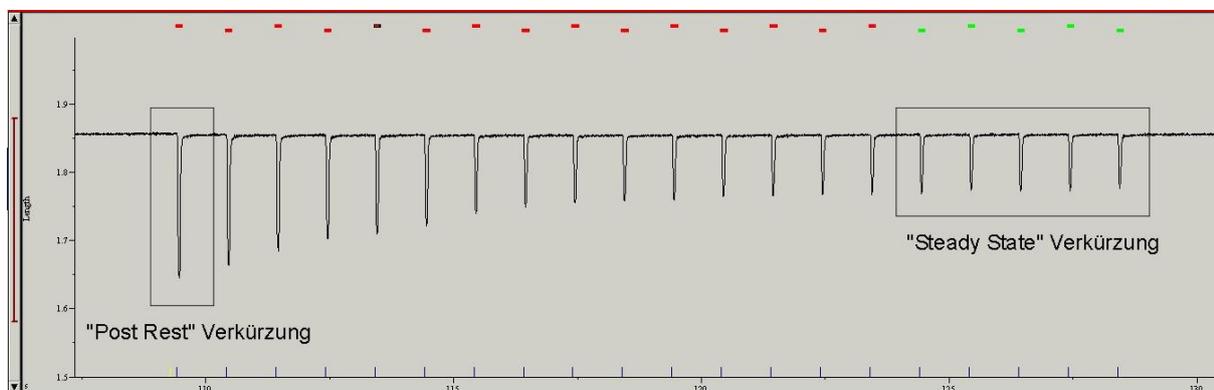


Abbildung 2.4: Originalregistrierung einer Sarkomerverkürzungsmessung einer murinen Kardiomyozyte bei 1 Hz Stimulationsfrequenz

Die „Post Rest“ Verkürzung und die zur Auswertung der „Steady State“ Verkürzung verwendeten letzten fünf Verkürzungen sind graphisch gekennzeichnet.

Anhand des mit der Messung aufgezeichneten Reizsignals mittelte IonOptix Wizard die letzten fünf Verkürzungen. Die Auswertungssoftware legte sowohl durch die gemittelte Verkürzung als auch durch die einzelne Verkürzung einen Fit, der zur Berechnung der folgend aufgeführten Parameter diente (Abbildung 2.5):

- Sarkomerlänge in Ruhe
- Verkürzungsamplitude: Differenz der Ruhesarkomerlänge zur Sarkomerlänge zum Zeitpunkt der maximalen Verkürzung
- Verkürzungsdauer: Dauer vom Reizbeginn bis zur 90%igen Relaxation mit einer Sarkomerlänge entsprechend 90% der Ruhesarkomerlänge
- Verkürzungsgeschwindigkeit: Anstiegssteilheit der Verkürzung
- Relaxationsgeschwindigkeit: Abstiegssteilheit in der Erholungsphase

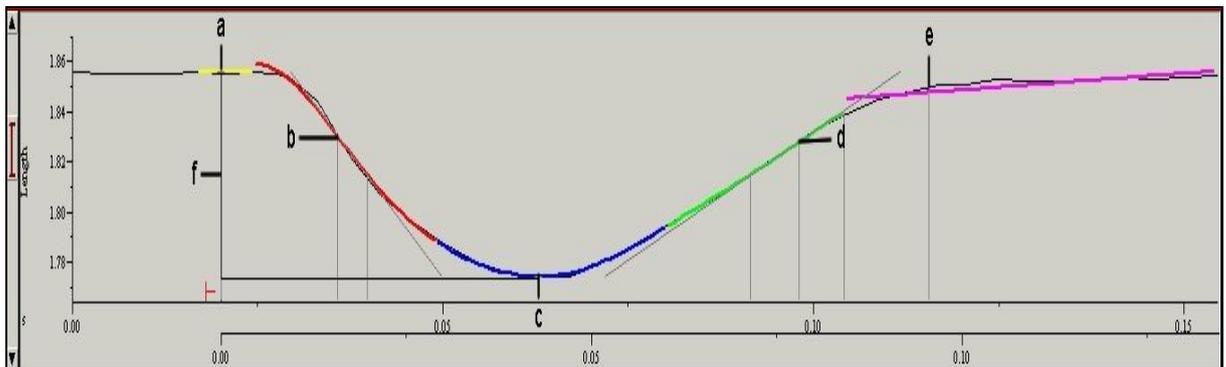


Abbildung 2.5: *Gemittelte Sarkomerverkürzung im Gleichgewichtszustand einer murinen Kardiomyozyte bei 1 Hz Stimulationsfrequenz*

Die auszuwertenden Parameter sind graphisch dargestellt. a: Sarkomerlänge in Ruhe; b: Verkürzungsgeschwindigkeit; c: maximale Sarkomerverkürzung; d: Relaxationsgeschwindigkeit; e: Verkürzungsdauer bis zur 90%igen Relaxation; f: Verkürzungsamplitude

Das Software Programm Igor (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) transformierte die aus IonWizard als *.txt-Datei exportierten Daten in ein .xls Format (MS Excel 2000, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Eine Access Datenbank (MS Access 2000, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwaltet die Messergebnisse. Ebenso ermöglichte diese eine gezielte Abfrage der Untersuchungsergebnisse. Anschließend wurden die gemittelten Daten (MS Excel, 2000) mithilfe von Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) graphisch dargestellt.

Frequenzbedingte Korrektur der Ruhesarkomerlänge und der Verkürzungsamplitude bei der Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht

Ab 6 Hz konnte mit zunehmender Reizfrequenz eine Absenkung der Ruhesarkomerlänge nach einer erfolgten Verkürzung beobachtet werden. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Verkürzungen war nicht mehr ausreichend für eine vollständige Relaxation der Zelle. Nach Beendigung der Stimulation stellte sich mit einer geringen Latenzzeit wieder die ursprüngliche Ruhesarkomerlänge ein (Abbildung 2.6).

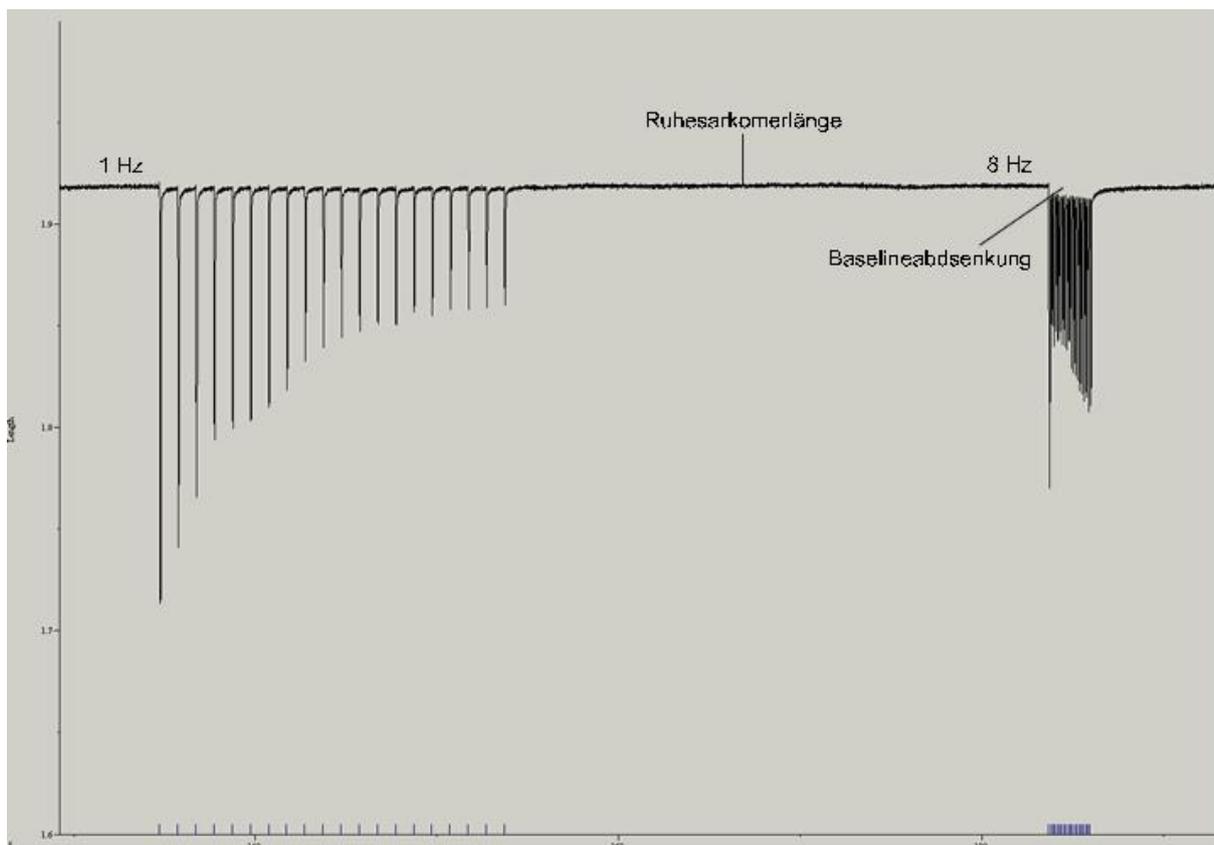


Abbildung 2.6: *Originalregistrierung der Sarkomerverkürzung einer murinen Kardiomyozyte bei 1 und 8 Hz Stimulationsfrequenz*
Bei 8 Hz Stimulationsfrequenz ist die Dauer zwischen zwei Stimulationen nicht mehr ausreichend für eine vollständige Relaxation der Zelle.

Die oben beschriebene Auswertungsweise verzerrte die Werte der Verkürzungsamplitude und der Ruhesarkomerlänge. Daher wurde die Ruhesarkomerlänge direkt vor der ersten Stimulationsantwort bestimmt. Die Differenz zwischen manuell ermittelter und vom Programm bestimmter Ruhesarkomerlänge, addiert zur Verkürzungsamplitude, korrigierte diesen Wert.

2.3.4.2 Die Herztreppe nach Stimulationspause

Nach einer Stimulationspause zeigten die Herzmuskelzellen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz ein unterschiedliches Verhalten bis zur Einstellung eines Gleichgewichtszustandes. Zur Analyse dieses Verkürzungsverhaltens wurden mehrere komplette Verkürzungsserien der jeweiligen Frequenz als *.txt-Datei aus IonWizard nach Excel exportiert. Diese Verkürzungsserien wurden ausgehend vom Zeitpunkt des ersten Reizes gemittelt. Ein 20 ms dauernder Vorlauf diente zur Bestimmung der Ruhesarkomerlänge. Eine anschließende Normierung der Messwerte auf die gemittelte Ruhesarkomerlänge verhinderte eine Beeinflussung der kalkulierten Standardabweichungen der Verkürzungsamplituden durch unterschiedliche Ausgangs-Ruhesarkomerlängen. Des Weiteren konnte unter Verwendung von Excel das Maximum der einzelnen Verkürzungen ausgehend von der normierten Kurve bestimmt werden. Sowohl Mittelwerte, Standardabweichungen und die Zeitpunkte der Verkürzungsmaxima als auch die dazugehörige normierte, gemittelte Originalkurve wurde nach Prism 3.0 exportiert. Prism 3.0 ermöglichte sowohl die graphische Darstellung der gewonnenen Daten als auch die Anpassung der folgenden zweifach exponentiellen Funktion an die Verkürzungsmaxima.

$$Y = [SS_1 - (SS_1 - Post Rest) e^{-x/\tau_1}] + (SS_1 - SS_2) e^{-x/\tau_2} - (SS_1 - SS_2) \quad (2.1)$$

„Post Rest“ ist die Sarkomerlänge beim Verkürzungsmaximum der ersten Verkürzung. Im Falle eines negativen Herztreppenverlaufes repräsentiert SS_1 die Sarkomerlänge im Gleichgewichtszustand. Wird die „Post Rest“ Verkürzung jedoch von einer positiven Herztreppe gefolgt, stellt SS_1 einen Sarkomerlängenwert in der Nähe der Ruhesarkomerlänge dar. SS_2 ist dann der Sarkomerlängenwert im Gleichgewichtszustand. Die aus dieser Gleichung resultierenden Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 wurden in Abhängigkeit von der Frequenz untersucht. Im Falle einer negativen Herztreppe sind SS_1 und SS_2 identisch. Dann wurde nur der erste Summand der Gleichung an die Daten angepasst.

2.4 Elektrophysiologische Messungen – Die Patch-clamp-Technik

Die Patch-clamp-Technik stellt eine elektrophysiologische Standardmethode dar. Daher soll hier auf eine ausführliche Beschreibung der Messtechnik verzichtet werden. Detaillierte Methodenbeschreibungen sind z.B. bei HAMILL et al. (1981), NUMBERGER & DRAGUHN (1996) und POLDER et al. (2005) nachzulesen.

2.4.1 Der Versuchsaufbau

Die Patch-clamp-Untersuchungen fanden an einem ähnlichen Versuchstand wie unter 2.3.1 beschrieben statt. Daher sollen hier nur die für die Patch-clamp-Untersuchung notwendigen Komponenten näher erläutert werden. Als Messverstärker wurde ein konventioneller Patch-clamp Verstärker (L/M EPC 7, List Medical Electronic, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Messelektroden (Patch-Pipetten) wurden mithilfe des Elektrodenziehgerätes L/M -3P-A (List Medical Electronic, Darmstadt, Deutschland) aus Borsilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) gezogen. Abhängig von der Untersuchungsmethode und den dazugehörigen Pipettenlösungen (Kapitel 2.11.3) hatten die Patch-Pipetten einen Eingangswiderstand von 2-10 M Ω . Ein aus Acrylglas bestehender Pipettenhalter erlaubte eine direkte rechtwinklige Montage der Pipette am Vorverstärker, der auf einem hydraulischen Mikromanipulator (MO-103N, Narishige, Tokyo, Japan) montiert war. Die auftretenden Diffusionspotentiale wurden vor Annäherung der Elektrode an die Zelloberfläche über eine interne Gegenspannung im Verstärker auf Null abgeglichen. Zellkapazität und Serienwiderstand (4-10 M Ω) wurden ebenso durch den Verstärker kompensiert. Ein PC, ausgestattet mit dem Hard- und Softwarepaket pClamp 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), diente zur Versuchssteuerung und Datenerfassung. Die Strom- und Spannungssignale wurden online mit 3 kHz gefiltert und bei einer Sampling-Rate von 16-20 kHz (zur Bestimmung der Zellkapazität: 100 kHz) mit 12-bit Auflösung digitalisiert (A/D-Wandler: Digidata 1200; Axon Instruments).

Sämtliche Experimente wurden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ in der Ganzellkonfiguration im voltage-clamp (L-Typ Calciumstrommessungen) oder current-clamp (Aktionspotentialmessungen) Modus durchgeführt.

2.4.2 Untersuchung des L-Typ Calciumstromes

2.4.2.1 Rampenförmige Spannungsklemme zur Bestimmung der Membrankapazität

Jedes Experiment begann mit der Messung der Membrankapazität. Da Zellmembranen eine spezifische Kapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (SHERMAN-GOLD, 1993) besitzen, ist die absolute Kapazität ein Maß für die Größe der Zelle. Somit können Ströme verschieden großer Zellen durch Normierung auf die Membrankapazität miteinander verglichen werden.

Die zur Messung der Membrankapazität verwendete rampenförmige Spannungsklemme ist in Abbildung 2.7 graphisch dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential bei -80 mV wurde die Spannung für 200 ms auf -40 mV vorgeklemmt. Darauf folgte eine schnelle Spannungsrampe von -40 auf -50 mV . Die Steigung der Rampe (dV/dt) betrug $5,5 \text{ mV}/\text{ms}$. Der kapazitive Strom während dieser Rampe wurde gemessen.

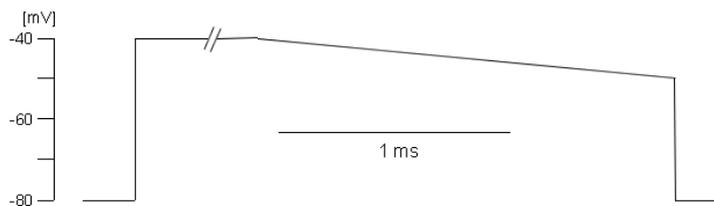


Abbildung 2.7: *Rampenförmige Spannungsklemme zur Bestimmung der Membrankapazität*
 Zu beachten ist die Unterbrechung der Vorklemme auf -40 mV , die insgesamt 200 ms dauerte. Das Protokoll wurde fünfmal auf die Zelle appliziert.

2.4.2.2 Rechteckförmige Spannungsklemme zur Bestimmung des L-Typ Calciumstromes

Zur Messung des L-Typ Calciumstromes ($I_{\text{Ca,L}}$) wurde eine rechteckförmige Spannungsklemme als Doppelpulsprotokoll mit repolarisierendem Zwischenpuls (ECKERT & TILLOTSON, 1981; LUO & RUDY, 1994) appliziert (Abbildung 2.8). Um den $I_{\text{Ca,L}}$ von den überlappenden Natrium-, Kalium- und T-Typ Calciumstrom zu trennen, wurden diese elektrisch inaktiviert oder pharmakologisch blockiert. CsCl ersetzte Kalium sowohl in der Pipetten- als auch in der Badlösung (Kapitel 2.11.3). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV inaktivierte eine 200 ms dauernde Vorklemme auf -35 mV den schnellen Natriumstrom (BROWN et al., 1981) und den T-Typ Calciumstrom (NILIUS et al., 1985). Die erste Testklemme (T1) auf Potentiale zwischen -40 und $+60 \text{ mV}$ (Abstufung: 5 mV ,

Dauer: 400 ms) diente der Ermittlung der Strom/Spannungsbeziehung und der „Steady State“ Aktivierung (d_{∞}). Ein zwei Millisekunden dauernder Zwischenpuls klemmte die Zelle auf -40 mV zurück. Anschließend folgte die zweite Testklemme (T2) auf +10mV (Dauer: 400 ms) zur Bestimmung der „Steady State“ Inaktivierung (f_{∞}). Das Klemmprotokoll endet mit dem Haltepotential von -80 mV. Die Stimulationsfrequenz betrug 0,2 Hz.

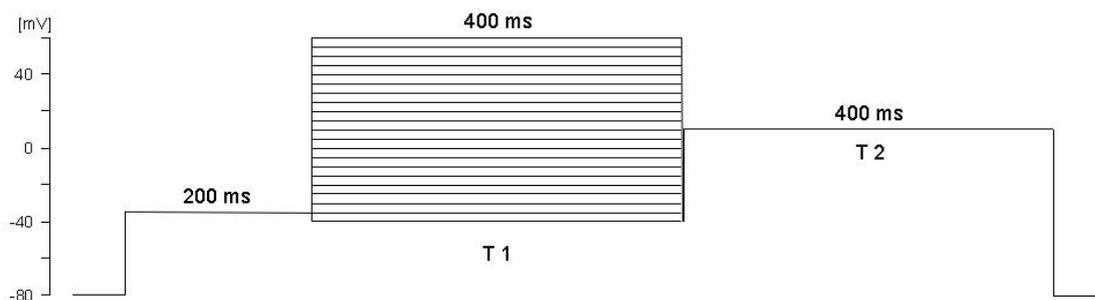


Abbildung 2.8: *Rechteckförmige Spannungsklemme zur Bestimmung des L-Typ Calciumstromes*
 T1 diente zur Ermittlung der Strom/Spannungsbeziehung und der „Steady State“ Aktivierung (d_{∞}) und T2 zur Bestimmung der „Steady State“ Inaktivierung (f_{∞}). Der repolarisierende Zwischenpuls zwischen T1 und T2 brachte den d Parameter unabhängig von T1 auf einen konstanten Ausgangswert. Aufgrund der unterschiedlichen Zeitabhängigkeiten von d_{∞} und f_{∞} blieb der f Parameter während des repolarisierenden Zwischenpulses nahezu unverändert. f_{∞} war nun der einzige variable Parameter während T2 und konnte so unabhängig der Stellung der d -Tore bestimmt werden (LUO & RUDY, 1994; LINZ, 1996).

2.4.2.3 Auswertung und mathematische Aufbereitung der Messdaten

2.4.2.3.1 Die Membrankapazität

Die Membrankapazität (C_M) konnte mithilfe des während der Spannungsrampe geflossenen kapazitiven Stroms (I_C) und der bekannten, konstanten Steigung der Rampe dV/dt (Kapitel 2.4.2.1) nach Gleichung (2.2) berechnet werden.

$$I_C = C_M \times dV / dt \quad (2.2)$$

2.4.2.3.2 Der L-Typ Calciumstrom

Die Auswertung und mathematische Aufbereitung der L-Typ Calciumstrom Messdaten ist unter LINZ (1996) näher beschrieben und soll daher hier nur kurz dargestellt werden.

Strom/Spannungsbeziehung

Die während T1 gemessenen Spitzenstromwerte ($I_{Ca,L}$) wurden auf die jeweilige Membrankapazität normiert und in Abhängigkeit des entsprechenden Testpotentials als Strom/Spannungsbeziehung aufgetragen. An die ermittelten Werte der Strom/Spannungsbeziehung wurde Gleichung 2.3 angepasst.

$$I_{Ca,L} = \frac{G_{\max} (V - V_{rev})}{1 + \exp \frac{V - V_{1/2}}{k}} \quad (2.3)$$

G_{\max} : maximale Leitfähigkeit

V_{rev} : Umkehrpotential

$V_{1/2}$: Potential der halbmaximalen Aktivierung

k : Steigung der Aktivierungskurve

Aktivierungskurve

Zur Bestimmung des Aktivierungsparameters d_{∞} musste zunächst zu jeder Strom/Spannungsbeziehung das Umkehrpotential (V_{rev}) (Gleichung 2.3) und anschließend die Spitzenleitfähigkeit bei jedem Klemmpotential nach Gleichung 2.4 berechnet werden (RASSMUSSEN et al., 1990).

$$g_{Ca}(V) = \frac{I_{Ca,L}}{V - V_{rev}} \quad (2.4)$$

Die erhaltenen Werte wurden auf die maximale Spitzenleitfähigkeit normiert (i.d.R. bei 0 mV) und in Abhängigkeit von T1 dargestellt. Eine nichtlineare Regression (Gleichung 2.5) fittete die normierten Werte und beschreibt die Potentialabhängigkeit von d_{∞} .

$$d_{\infty} = \left(1 + \exp \frac{V - V_{1/2}}{k}\right)^{-1} \quad (2.5)$$

Inaktivierungskurve

Die während T2 gemessenen Spitzenstromwerte dienen zur Bestimmung der Inaktivierungskurve. Diese Stromamplituden zeigen den Anteil des $I_{Ca,L}$, der während T1 nicht

inaktiviert wurde (Bestimmung der Restverfügbarkeit). Die Darstellung der auf den Maximalstrom normierten Werte erfolgte in Abhängigkeit der Potentialwerte von T1. Daraus ergab sich die Potentialabhängigkeit von f_{∞} . Die Summe zweier Boltzmannfunktionen (Gleichung 2.6) beschreibt diesen Zusammenhang (RASSMUSSON et al., 1990).

$$f_{\infty}(V) = \left(1 + \exp\left(\frac{V - V'}{k'}\right)\right)^{-1} + a \times \left(1 + \exp\left(\frac{V'' - V}{k''}\right)\right)^{-1} \quad (2.6)$$

$V'_{1/2}$ bzw. $V''_{1/2}$: Potential halbmaximaler Inaktivierung für die erste bzw. zweite Boltzmannfunktion

k' bzw. k'' : Steigung der ersten bzw. zweiten Boltzmannfunktion

a : Skalierungsfaktor

2.4.3 Die Aktionspotentialmessung

2.4.3.1 Ableitung von Aktionspotentialen

Die Ableitung von Aktionspotentialen (APs) erfolgte im Stromklemmmodus des Messverstärkers. Überschwellige Strompulse (0,5-1,0 nA) von 4 ms Dauer, über die Patch-Pipette auf die Zelle appliziert, lösten die APs aus. Das im Kapitel 2.3.3.2 beschriebene Reizmuster wurde ebenfalls zur Auslösung der APs verwendet.

2.4.3.2 Auswertung

Um das Verhalten der Aktionspotentiale im „Steady State“ zu untersuchen, wurden jeweils das Ruhemembranpotential (RP), die Aktionspotentialamplitude und die Zeitdauer bis zur 50%igen (APD_{50}) bzw. 90%igen (APD_{90}) Repolarisation der letzten fünf APs einer Frequenz bestimmt und anschließend gemittelt.

Die Stimulusartefakte variierten zellabhängig (Abbildung 2.9) und ermöglichten somit häufig keine genaue zeitliche Festlegung des Aktionspotentialbeginns (Aufstrich). Daher erfolgte die Bestimmung der Repolarisationsdauer ausgehend vom Zeitpunkt des Spitzenwertes.

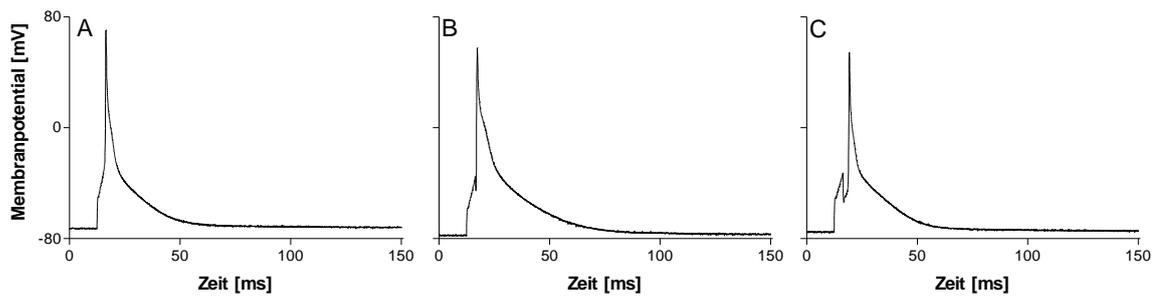


Abbildung 2.9: *Aktionspotentiale weiblicher WT Kardiomyozyten bei 1 Hz Stimulationsfrequenz*
 Aufgrund der variierenden Stimuli (A-C) ist der Beginn des Aktionspotentialaufstiegs nicht immer eindeutig definierbar. In A ist der Stimulus mit dem Aktionspotential Aufstreich verschmolzen.

2.5 Isolierung, Auftrennung und Nachweis von Proteinen

2.5.1 Isolation und Trennung von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen aus linken Ventrikel und isolierten Kardiomyozyten

Zur Proteinisolierung wurde linksventrikuläres Gewebe unter Stickstoffkühlung mit einem gekühlten Pistill in einem gekühlten Mörser zermahlen. Anschließend wurde das Pulver in ein auf -80°C gekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Mittels Differenzwägung wurde die Masse des Proteinpulvers bestimmt. Die Proteinisolierung aus isolierten Kardiomyozyten erfolgte in folgenden Schritten: Die isolierten Kardiomyozyten wurden mit PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Masse des Pellets wurde ebenfalls mittels Differenzwägung bestimmt. Die Trennung der Proteine in ihre cytoplasmatische und nukleäre Fraktion erfolgte mithilfe des NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Die cytoplasmatischen und nukleären Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe des BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

2.5.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die hydrophoben Bereiche der Proteine und verleiht dem Polypeptid eine negative Gesamtladung. So erhalten die Pro-

teine ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse. Daher erfolgte die Auftrennung der Proteine während der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine im Sammelgel fokussiert. Im Trenngel werden die Proteine dann aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt (GASSEN & SCHRIMPF, 1999). Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels wurde daher entsprechend der Größe des nachzuweisenden Proteins gewählt. Durchgeführt wurde die SDS-PAGE mit einer Elektrophoresekammer (Mini Protean II, Bio-Rad, München, Deutschland). 40 µg der Proteinproben wurden mit ddH₂O auf 30 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden 10 µl reduzierender 4x Probenpuffer hinzugegeben. Durch Erhitzen auf 95°C (5 Minuten) wurden die Proteine denaturiert. Anschließend wurden die hitzedenaturierten Proben und 15 µl Precision Plus ProteinTM Standard ALL Blue (Bio-Rad) in je eine Probenflasche des Gels pipettiert. An die Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 135 V (PowerPAC 3000, Bio-Rad) angelegt. Sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

2.5.4 Western-Blot von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Beim Western-Blotting wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf einen Nitrocellulosemembran übertragen, um dort diese mittels markierter Antikörper nachzuweisen. Der Blotting-Sandwich (ein Schwamm, Whatman-Papier, das Westernblot-Gel, die Nitrocellulosemembran, ein weiteres Whatman-Papier und ein weiterer Schwamm, alles in Transferpuffer getränkt) wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gehängt. Der Transfer erfolgte bei 100 mA über Nacht (16 Stunden). Die Effizienz des Blotvorgangs wurde mittels einer Ponceaufärbung überprüft. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran für 2 min in der Ponceau-Proteinfärbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen, um den Hintergrund zu entfärben.

2.5.5 Immunologischer Nachweis der Proteine

Vor Beginn der Nachweisreaktion wurde die Nitrocellulosemembran unter Schütteln in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend folgte die eigentliche Nachweisreaktion. Hierfür wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem gegen das gesuchte Protein gerichtete Erst-Antikörper inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurde die Membran dreimal (je 10 min) in Waschlösung I

gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem gegen den Erst-Antikörper gerichteten Zweit-Antikörper (gekoppelt mit einer Peroxidase) bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (3x5 Minuten Waschlösung II und 3x5 Minuten Waschlösung I) wurde die Nitrocellulosemembran eine Minute bei Raumtemperatur in Lumineszenzreagenz (Western LigtheningTM, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA) inkubiert. Abschließend erfolgte die Visualisierung des Signals durch Schwärzung eines Röntgenfilms (FUJI Medical X-Ray Film 100 Nif, Fuji, Tokyo, Japan).

2.5.6 Bildliche Verarbeitung der Röntgenfilme

Ein Scanner (Epson Perfection 1670, Seiko Epson, Meerbusch, Deutschland) digitalisierte die Röntgenfilme mit einer Auflösung von 600 dpi. Zur densitometrischen Auswertung wurde die Software AIDA v3.45 (raytest, Straubenhardt, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden die Banden markiert und Intensität sowie Breite der Banden verglichen. Die optische Dichte der Banden wird als Intensität pro Fläche abzüglich des Hintergrunds ausgegeben (Intensity/Area-Bkg). Die Bande mit der höchsten Intensität wurde zur graphischen Darstellung als Referenzwert auf 100% gesetzt. Dazu wurden die übrigen Banden des gleichen Blots in Relation gesetzt.

2.6 Anästhesie

2.6.1 Inhalationsanästhesie

Als Inhalationsanästhetikum wurde eine Isofluran (Forene, Tabelle 2.1) Sauerstoffmischung (medizinischer O₂) verabreicht. Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Inhalationskammer mit 2% Isofluran und einem O₂-Frischgasfluss vom 1 l/min. Nach Fixierung des sedierten Tieres auf einem beheizten Operationstisch wurde die Narkose über einem Nasenkonus aufrechterhalten. Die Narkosetiefe variierte während der Untersuchungen. Chirurgische Eingriffe wurden unter 2%iger und Messungen unter 1%iger Isoflurananästhesie durchgeführt. Die erniedrigte Konzentration minimierte den kardio-depressiven Effekt des Anästhetikums. Zum Anfluten der jeweiligen Konzentration wurde die Flussrate auf 2,5 l/min für kurze Zeit hochgestellt und anschließend wieder auf 1 l/min herunterreguliert. Die Messungen erfolgten erst nach zweieinhalbminütiger

Anästhesie bei 1% Isofluran. Aufgrund des niedrigen Verteilungskoeffizienten Blut/Gas finden Reaktionen auf veränderte Isofluran-Konzentrationen rasch statt (www.vetpharm.unizh.ch/TAK/05000000/00055999.01, zuletzt am 01.02.2009). Daher war diese geringe Zeitspanne ausreichend, um eine veränderte Narkosetiefe einzustellen.

2.6.2 Injektionsnarkose

Als Injektionsnarkotikum wurde eine Kombination aus Ketamin S (Esketaminhydrochlorid; Ketanest, Tabelle 2.1) und Xylazin (Xylanzinhydrochlorid; Rompun, Tabelle 2.1) eingesetzt. Initial wurde subkutan 90 mg Ketamin S/kg Körpergewicht (KG) + 12 mg Xylazin/kg KG verabreicht. Nach 30 und 50 min war eine Nachinjektion von 6 mg/kg KG Ketamin S notwendig.

Bei Xylazin handelt es sich um ein zentrales Sympatholytikum, welches die Herzfrequenz auf ca. 250-300 Schläge/Minute senkt.

2.7 Das Elektrokardiogramm

2.7.1 Messung

Das Elektrokardiogramm wurde mittels der zweiten Ableitung nach EINTHOVEN (bipolare Ableitung) bestimmt. Zwei Elektroden (Kanülenspitzen), eine in der linken Hinterpfote und die zweite in der rechten Vorderpfote, leiteten die Spannungsänderungen ab, die zunächst amplifiziert und anschließend digitalisiert wurden. Chart v4 for Windows (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) zeichnete die Messdaten auf. Die EKG Messung erfolgte unter Inhalationsnarkose (Kapitel 2.6.1).

2.7.2 Auswertung

Die EKG Auswertung erfolgte mithilfe der Signal-Averaged Electrocardiogram (SAECG) extension für Chart 4 für Macintosh. Zur Auswertung wurden fünfzig aufeinander folgende Zyklen über die R-Zacke gemittelt (Abbildung 2.10).

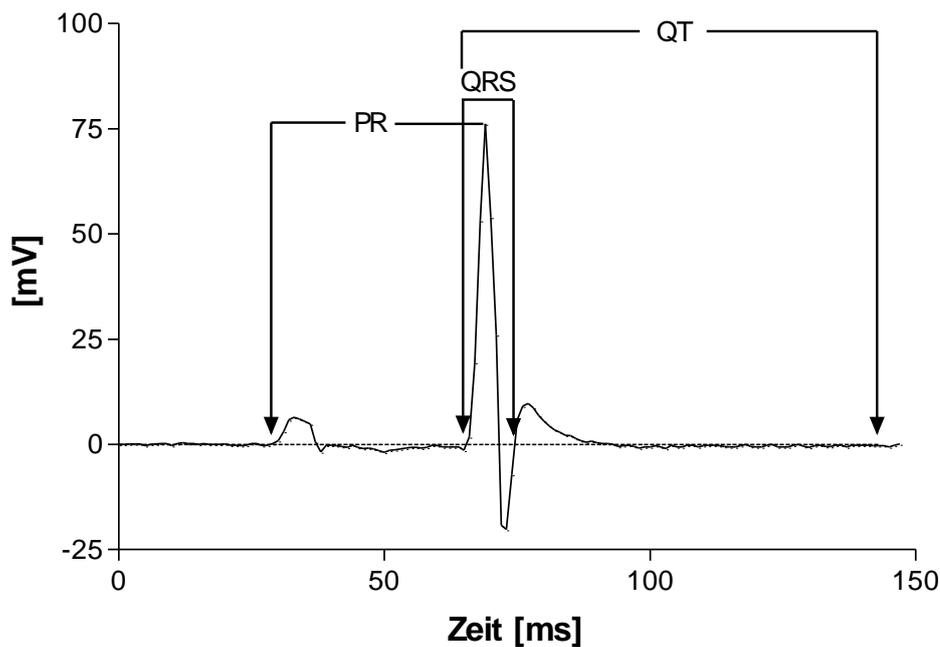


Abbildung 2.10: EKG-Aufzeichnung einer Maus

Beispielhaftes EKG einer weiblichen WT Maus mit der Erklärung der EKG Parameter. 50 aufeinander folgende EKGs wurden über die R-Zacke gemittelt. Die T-Welle schließt sich direkt an die S-Zacke an und ist häufig bipolar. ----- isoelektrische Linie

Die EKG Auswertung orientierte sich an der von HAGENDORFF et al. (1999) beschriebenen Methode. Die P-Welle stellt die Vorhoferregung und der QRS Komplex die Kammererregung dar. Der QRS Komplex ist definiert vom Beginn der Q-Zacke bis zum Schnittpunkt der S-Zacke mit der isoelektrischen Linie. Das QT-Intervall als Maß für die Zeit der Kammererregung und Repolarisation beginnt an der Q-Zacke und endet mit Rückkehr der uni- oder bipolaren T-Welle zur isoelektrischen Linie.

Die Frequenzkorrektur des QT-Intervalls (QT_c) nach MITCHELL et al. (1998) (Gleichung 2.7) berücksichtigt die hohen und auch unter Narkose stark variierenden Herzfrequenzen der Maus.

$$QT_c = \frac{QT}{\left(\frac{RR}{100}\right)^{1/2}} \quad (2.7)$$

QT_c = herzfrequenzkorrigiertes QT-Intervall

RR= durchschnittliche RR-Intervall in ms

2.8 Hämodynamik

2.8.1 Invasive Blutdruck und Herzdruckmessung

Zur weiteren Charakterisierung des kardialen Phänotyps wurden invasive Blutdruck- und Herzdruckmessungen unter Verwendung eines 1,4 French Millar-Katheters (Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA) durchgeführt. Mithilfe eines PowerLab „data acquisition“ Systems und der Chart v4 software (ADInstruments), konnten die Messdaten aufgezeichnet und anschließend analysiert werden. Die Messungen fanden unter Inhalationsnarkose (Kapitel 2.6.1) bei 37°C Körpertemperatur statt. Ein Feedback Temperaturfühler (Pt 100, Greisinger Electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland) im Rektum der Tiere regulierte die Körpertemperatur mithilfe einer Wärmelampe. Die intraperitoneale Injektion von 0,1 ml Heparin-NaCl Lösung (10 I.U. Heparin/ml, Liquemin N 7500) vor Einführung des Katheters verhinderte Blutkoagulationen. Die chirurgischen Eingriffe und die Katheterisierung wurden unter stereomikroskopischer Sicht (Zeiss, OpMi-191294, 60-100 fache Vergrößerung) durchgeführt.

Ein Hautschnitt von submental bis prästernal ermöglichte es, die Arteria carotis communis dextra freizupräparieren. Drei jeweils ca. 10 cm lange 5-0 Seidenfäden wurden um das Gefäß gelegt. Ein Faden diente zur Ligation des Gefäßes mittels eines Knotens im kranialen Bereich, die anschließende Fixation des Fadens führte zur leichten Spannung des Gefäßes. Mit einem weiteren Faden wurde die Arterie kaudalwärts gespannt und somit komprimiert. Nach einer ventralen Inzision konnte der Millar Katheter eingeführt und anschließend mittels des dritten Fadens fixiert werden (Abbildung 2.11).

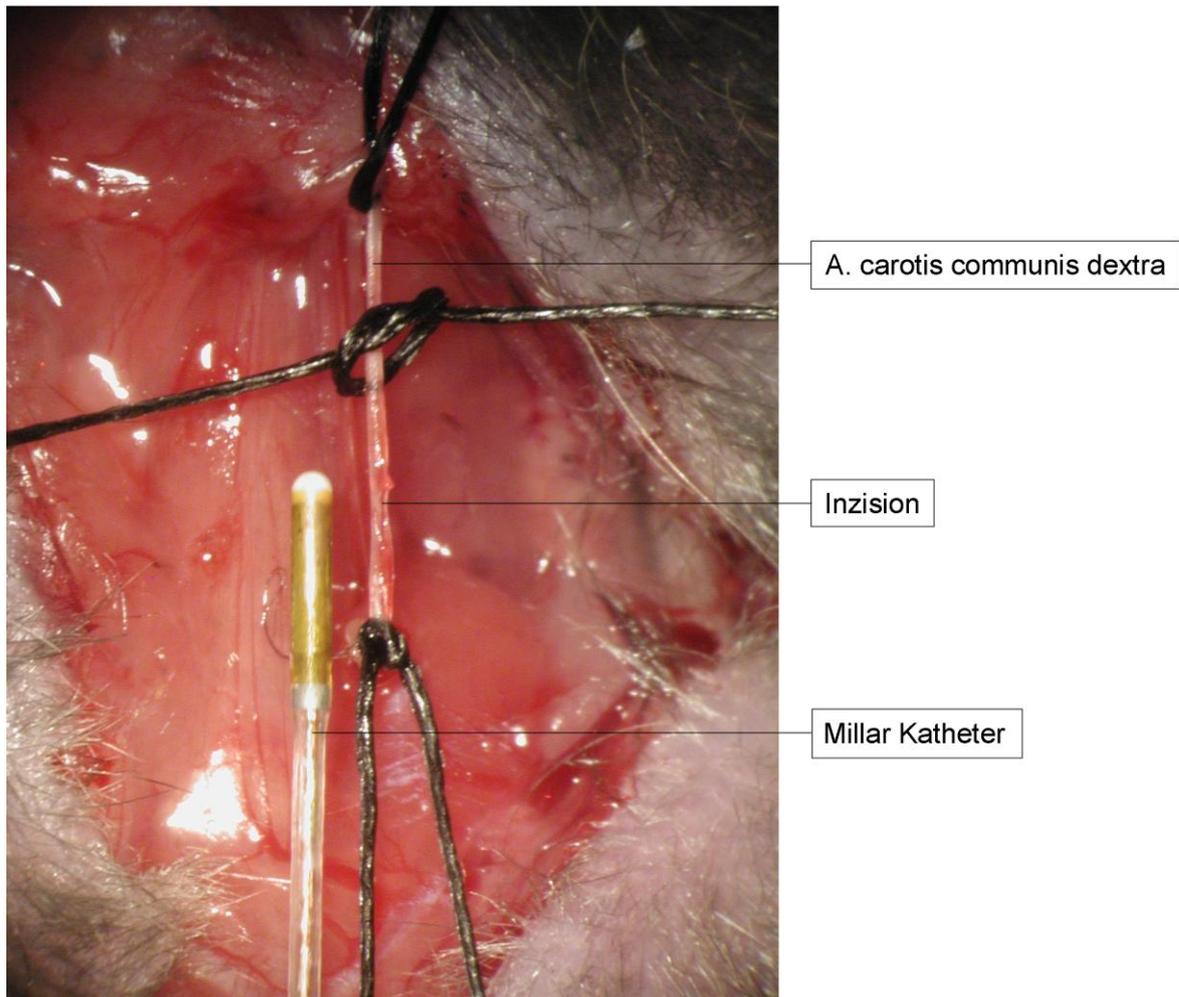


Abbildung 2.11: Freipräparierte A. carotis communis dextra nach Inzision mit Millar Katheter
 Nach leichtem Spreizen des Gefäßes mit einem Haken wird der Millar Katheter mithilfe einer Uhrmacher-Pinzette eingeführt, vorgeschoben und anschließend fixiert. 10-fache Vergrößerung.

Die Registrierung der peripheren Blutdruckparameter (systolischer Blutdruck (SBP), diastolischer Blutdruck (DBP) und mittlerer arterieller Blutdruck (MABP)) fanden in der Arteria carotis communis dextra statt.

Nachfolgend wurde der Katheter unter Druckkontrolle in den linken Ventrikel vorgeschoben. Ein akuter diastolischer Druckabfall zeigte den Übergang aus der Aorta in den linken Ventrikel an. Der Sensor registrierte die Herzdruckkurve aus der online der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP), der linksventrikuläre diastolische Druck (LVDP), als auch die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) und maximale Druckabfallsgeschwindigkeit ($-dp/dt_{min}$) abgeleitet wurden.

2.8.1.1 Herzdruckmessung unter Dobutamin-Stimulation

Mittels Dobutamin-Stimulation lassen sich Unterschiede in der Herzaktivität verifizieren. Dobutamin ist ein Beta-Sympathomimetikum mit positiv chronotroper und inotroper Wirkung. Um die körpereigene Sympathikusaktivität zu dämpfen, wurde dieses Experiment unter Ketamin Xylazin (zentrale Sympathikolyse) Narkose durchgeführt (Kapitel 2.6.2). Zusätzlich zu der unter 2.8.1 beschriebenen Katheterisierung wurde noch ein Zugang in die Vena jugularis sinistra gelegt. Dobutamin wurde über diesen Katheter mittels einer Infusionspumpe (Harvard Pump 22, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) in aufsteigender Dosierung (1, 4, 8, 10, 14, 22, 33, 40 [ng/g KG/min]) für jeweils zwei Minuten infundiert.

2.9 Organmaße

2.9.1 Bestimmung des Herzgewichtes

Zur Bestimmung des Herzgewichtes wurde dieses aus dem Tier entnommen und unmittelbar in Pufferlösung (PBS) überführt, gereinigt und anschließend in linken und rechten Ventrikel getrennt. Nach vorsichtigem Ausdrücken der Flüssigkeit auf Zellstoff erfolgte die Gewichtsbestimmung der einzelnen Ventrikel mit einer Feinwaage (Voyager, Ohaus, Giessen, Deutschland).

2.9.2 Bestimmung der Tibialänge

Nach Freipräparation der Tibia konnte ihre Länge (TL) mithilfe einer Messlehre (Mausser, St. Denis, Frankreich) mit einer Genauigkeit von 0,1 mm bestimmt werden.

2.10 Statistische Auswertung der Daten

Zur Ermittlung der Mittelwerte wurden Ergebnisse von mindestens fünf Tieren berücksichtigt. Mittelwerte werden als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichungen (SD) oder als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Zum Vergleich zweier Mittelwerte wurde ein ungepaarter, zweiseitiger Student's t-Test auf einem Signifikanzniveau von 95% durchgeführt. Multiple Mittelwertvergleiche erfolgten

mittels Varianzanalyse (ANOVA mit 1 Faktor) mit Newman-Keuls Post Test. Eine mehrfaktorielle ANOVA mit Bonferoni-Test bestimmte die Wechselwirkungen zweier Faktoren. Folgende Signifikanzschranken wurden festgesetzt:

$p > 0,05$	nicht signifikant	
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p \leq 0,01$	hoch signifikant	**

2.11 Lösungen und Chemikalien

2.11.1 Präparation und Zellisolierung

Ca²⁺-freie Tyrode (in mM): NaCl, 135; KCl, 4; MgCl₂, 1; EGTA, 2,6; Glucose, 11; HEPES, 2 (pH 7,4 mit NaOH)

Hochkaliumhaltige Lösung (HKL) (in mM): NaCl, 4; KCl, 10; K-Glutamat, 130; CaCl₂, 0,025; MgCl₂, 1; Glucose, 10; HEPES, 4 (pH 7,4 mit KOH)

Präparationstyrode (in mM): NaCl, 135; KCl, 4; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1; Glucose, 11; HEPES, 2; BSA 1 g/l; Trypsininhibitor 0,0167 g/l (pH 7,4 mit NaOH)

2.11.2 Optische Sarkomerverkürzungsmessung

Messtyrode: s. 2.11.1 Präparationstyrode

Messtyrode mit halber Calciumkonzentration: s. 2.11.1, jedoch mit 0,9 mM CaCl₂

Messtyrode mit doppelter Calciumkonzentration: s. 2.11.1, jedoch mit 3,6 mM CaCl₂

Messtyrode mit vierfacher Calciumkonzentration: s. 2.11.1, jedoch mit 7,2 mM CaCl₂

2.11.3 Patch-clamp-Experimente

Externe Lösungen (Badlösungen)

Standardtyrode (in mM): NaCl, 135; KCl, 4; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1; Glucose, 11; HEPES, 2 (pH 7,4 mit NaOH)

Messtyrode I_{Ca,L} (in mM): NaCl, 140; MgCl₂, 0,5; CaCl₂, 1,8; CsCl, 5; Glucose, 5,5; HEPES 5 (pH 7,4 mit CsOH)

Interne Lösungen (Pipettenlösungen)

Pipettenlösung I_{Ca, L} (in mM): CsCl, 130; MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 1; C₄H₈N₃O₅PNa₂, 3,6; Mg-ATP, 5; HEPES, 10; EGTA, 2,5 (pH 7,2 mit CsOH)

Pipettenlösung AP 1 (in mM): KCl, 130; MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 1; C₄H₈N₃O₅PNa₂, 3,6; Mg-ATP, 5; HEPES, 10; EGTA, 10 (pH 7,2 mit NaOH)

Pipettenlösung AP 2 (in mM): K-Aspartat, 110; KCl, 20; NaCl, 4; EGTA, 10; Mg-ATP, 5; HEPES, 10 (pH 7,2 mit KOH)

2.11.4 Organentnahme

PBS (in mM): NaCl, 137; KCl, 2,7; Na₂HPO₄ x 2H₂O, 8,1; KH₂PO₄, 1,5 (pH 7,5 mit NaOH)

2.11.5 Proteinbestimmung

2.11.5.1 Lösungen und Puffer

Blockierlösung: BSA, 5% (w/v); Tween® 20, 0,1% (v/v); in TBS (pH 7,4)

5x Laufpuffer (in mM): Tris, 124; Glycin, 960; SDS, 17 (pH 8,3), in H₂O

Ponceau-Proteinfärbelösung: in Trichloressigsäure (3%), Ponceau S, 2% (w/v)

4x Probenpuffer (in mM): Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8), 125; Glycerin, 20% (v/v); SDS, 280; 2-6-Mercaptoethanol, 20% (v/v); Bromphenolblau, 0,05% (w/v)

10x TBS-Puffer (in M): Tris (pH 7,6), 0,2; NaCl, 1,37; in H₂O

Transferpuffer (in mM): Tris, 25; Glycin, 190; Methanol, 20% (v/v); in H₂O

Waschlösung I: BSA, 1% (w/v); Tween® 20, 0,1% (v/v); in TBS

Waschlösung II: BSA, 1% (w/v); Tween® 20, 0,3% (v/v); in TBS

2.11.5.2 SDS-Gele

Trenngel (7,5; 12,5%) (in mM): Acrylamid/Bis, 7,5, 12,5%; Tris (pH 6,8), 375 mM; SDS, 3,5 mM; Ammoniumperoxodisulfat, 0,03% (w/v); TEMED, 0,05% (v/v), in H₂O

Sammelgel (in mM): Acrylamid/Bis, 4,8%; Tris (pH 6,8), 125; SDS, 3,5; Ammoniumperoxodisulfat 0,05% (w/v); TEMED 0,15% (v/v), in H₂O

2.11.6 Verwendete Chemikalien

Sofern im Text nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Tabelle 2.1 zeigt eine Liste der wichtigsten eingesetzten Substanzen.

Tabelle 2.1: Stoffklasse und Hersteller der eingesetzten Substanzen

Stoffklasse	Substanz	Hersteller
Ca ²⁺ -Chelator	EGTA	Serva, Heidelberg, FRG
Puffer	HEPES	Merck, Darmstadt, FRG
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, FRG
	KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, FRG
Enzyme	Kollagenase, Typ L	Sigma, St. Lois, MO, USA
	Trypsin	Boehringer, Mannheim, FRG
	Trypsininhibitor	Sigma, St. Lois, MO, USA
Anästhetika	Forene (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden, FRG
	Ketanest (Ketamin S)	Pfizer GmbH, Karlsruhe, FRG
	Rompun (Xylazin)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, FRG
Beta Stimulanz	Dobutamin	Solvay Arzneimittel GmbH, Hannover, FRG
Sonstige Substanzen	BSA	Sigma, St. Lois, MO, USA
	BSA, Fraction V	PAA Laboratories, Pasching, AU
	Laminin	Sigma, St. Lois, MO, USA
Sonstige Substanzen	Mg-ATP	Sigma, St. Lois, MO, USA

Stoffklasse	Substanz	Hersteller
	30% Acrylamid/Bis Solution, 29 :1	Bio-Rad, München, FRG
	APS (Ammoniumpersulfat)	Bio-Rad, München, FRG
	TEMED (N,N,N',N'-tetramethyldiamid)	Bio-Rad, München, FRG
	Liquemin N 7500 (Heparin)	Roche, Mannheim, FRG

2.11.7 Antikörper

2.11.7.1 Erst-Antikörper

Die Erst-Antikörper wurden mit Blockierlösung verdünnt (Verdünnung in Klammern) verwendet.

anti-Kv 4.3 <i>rabbit polyclonal</i> , APC-017 (1:200)	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
anti-Kv 1.5 <i>rabbit polyclonal</i> , APC-004 (1:200)	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
anti-Phospholamban <i>mouse monoclonal</i> , 05-205 (1:500)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
anti-sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase 2a <i>mouse monoclonal</i> , MA3-910 (1:1500)	Dianova, Hamburg, FRG

2.11.7.2 Zweit-Antikörper

Die Zweit-Antikörper wurden mit Blockierlösung (1:5000) verdünnt verwendet.

Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase, NA931V Amersham, Buckinghamshire,
UK

Anti-rabbit IgG, Horeseradish Peroxidase, NA934V Amersham, Buckinghamshire,
UK

2.11.8 Kits

BCA Protein Assay Kit

Pierce, Rockford, IL, USA

Western Lightning™,
Chemiluminescence Reagent Plus

Perkin Elmer Life Science,
Boston, MA, USA

NE-PER™

Pierce, Rockford, IL, USA

Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen

Die Untersuchung der myozytären Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen erfolgte mithilfe eines Video Imaging Systems (Kapitel 2.3). Im Folgenden werden die Ergebnisse der Altersstudie (Kapitel 3.1.1) und die Untersuchungsergebnisse zum Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Sarkomerverkürzung (Kapitel 3.1.2) an weiblichen C57BL/6 Mäusen dargestellt. Des Weiteren wird die Bedeutung der Östrogenrezeptoren (ER) β (Kapitel 3.1.3) und α (Kapitel 3.1.4) für die myozytäre Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen beiderlei Geschlechts beschrieben.

3.1.1 Entwicklungsbedingte Veränderung der Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten

Die Sarkomerverkürzung isolierter Herzmuskelzellen unterschiedlicher Altersgruppen wurde gemessen, um eventuelle altersbedingte Veränderungen des Myokards aufzudecken. In den Altersgruppen 1-4 (Kapitel 2.1) variierte die Ruhesarkomerlänge von 1,84 bis 1,89 μm (AG 1: $1,862 \pm 0,006 \mu\text{m}$, $n=9$; AG 2: $1,867 \pm 0,008 \mu\text{m}$, $n=20$; AG 3: $1,890 \pm 0,008 \mu\text{m}$, $n=13$; AG 4: $1,843 \pm 0,005 \mu\text{m}$, $n=12$; Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD)). Die Ruhesarkomerlängen unterschieden sich zwischen den meisten Gruppen signifikant (AG 1 zu 3, 1 zu 4, 2 zu 4 und 3 zu 4). Es zeigte sich eine altersbedingte Zunahme der Ruhesarkomerlänge in jungen Tieren und eine Abnahme im fortgeschrittenen Alter (AG 4).

3.1.1.1 Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht

Die Verkürzungsamplitude der murinen Kardiomyozyten ist frequenzabhängig und beschreibt in allen AGs einen biphasischen Verlauf (Abbildung 3.1). Ausgehend von 0,5 Hz reduziert sich die Verkürzungsamplitude mit zunehmender Frequenz und erreicht ein Minimum bei 1-2 Hz (negative Verkürzungs-Frequenz-Beziehung). Mit steigender Stimulationsfrequenz (bis 6 Hz) erhöht sich die Verkürzungsamplitude (positive Verkürzungs-Frequenz-Beziehung). Die weitere Erhöhung der Stimulationsfrequenz bewirkte altersabhängig eine Zunahme, eine Abnahme oder ein Gleichgewicht der Verkürzungs-

amplitude (Abbildung 3.1). Innerhalb dieses Verlaufs ergaben sich altersabhängige Unterschiede. In allen Frequenzbereichen waren die Sarkomerverkürzungsamplituden der Herzmuskelzellen junger Tiere (AG 1) vermindert gegenüber den Werten erwachsener Tiere (AG 2, 3 und 4; Abbildung 3.1). Bei 0,5, 1, 4, 6 und 8 Hz sind diese signifikant unterschiedlich. Innerhalb der drei erwachsenen Altersgruppen (AG 2, 3 und 4) ergaben sich keine signifikant veränderten Verkürzungsamplituden in allen Frequenzbereichen. Daher wurden die Altersgruppen 2, 3 und 4 zu einer Gruppe zusammengefasst (AG 2-4) und in Abbildung 3.2 mit AG 1 verglichen.

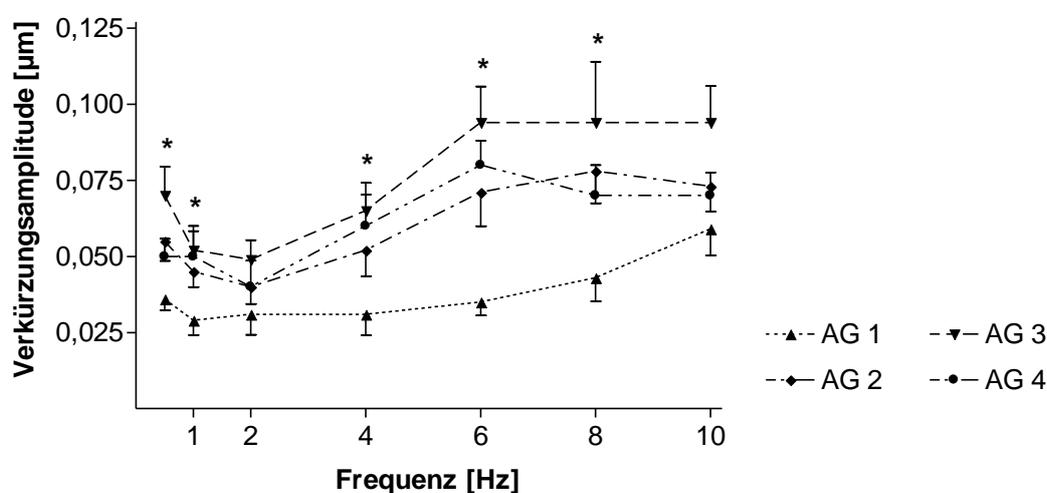


Abbildung 3.1: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung isolierter weiblicher Kardiomyozyten unterschiedlicher Altersgruppen

Die Verkürzungsamplituden der adulten Altersgruppen (AG) 2-4 unterschieden sich nicht signifikant. Die meisten Verkürzungsamplituden der AG 1 sind signifikant vermindert im Vergleich zu den älteren Tieren (0,5 Hz: AG 1 zu 3; 1 Hz: AG 1 zu 2, 3 und 4; 4 Hz: AG 1 zu 3 und 4; 6 Hz: AG 1 zu 2, 3 und 4; 8 Hz: AG 1 zu 2, 3 und 4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6-20 Zellen, $*p < 0,05$ im Vergleich zur AG 1.

Die Verkürzungsamplituden der in einer Gruppe zusammengefassten adulten Herzmuskelzellen (AG 2-4) zeigten das oben beschriebene Verhalten. Von 2 bis 6 Hz Stimulationsfrequenz war eine positive Verkürzungs-Frequenz-Beziehung zu beobachten. Mit steigender Frequenz erhöhte sich die Verkürzungsamplitude nicht weiter. Bei jungen Herzmuskelzellen war die Verkürzungs-Frequenzrelation weniger ausgeprägt. Die Verkürzungsamplituden waren in nahezu allen Frequenzbereichen signifikant vermindert, außer bei 2 und 10 Hz.

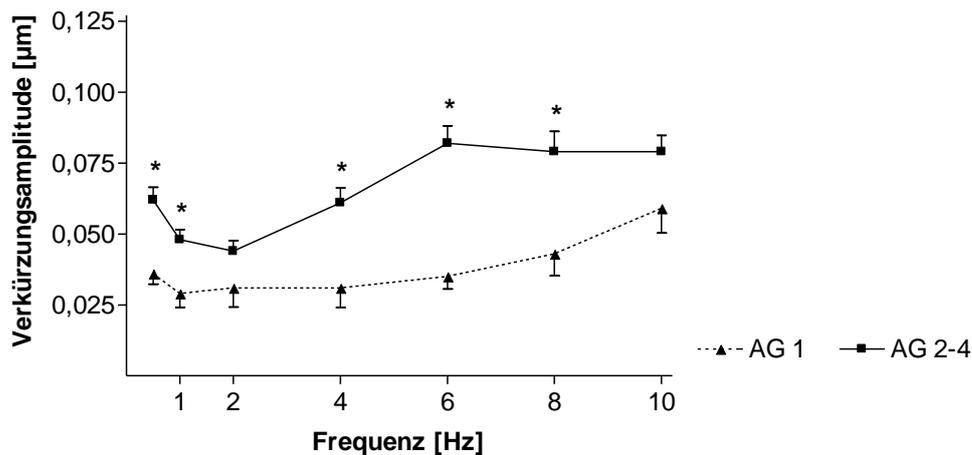


Abbildung 3.2: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung juveniler und adulter isolierter weiblicher Kardiomyozyten

Die Daten der adulten Kardiomyozyten wurden zu einer Altersgruppe (AG) zusammengefasst (AG 2-4). Die Verkürzungsamplituden der AG1 waren in fast allen Frequenzbereichen signifikant niedriger als die Werte der adulten Tiere außer bei 2 und 10 Hz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6-20 Zellen, * $p < 0,05$.

Einhergehend mit den verminderten Sarkomerverkürzungsamplituden der AG 1 im Vergleich zu adulten Tieren waren in dieser Gruppe auch die Verkürzungsgeschwindigkeiten (Abbildung 3.3) in allen Frequenzbereichen reduziert. Junge Kardiomyozyten verkürzten sich signifikant langsamer bei 1, 4, 6 und 8 Hz im Gegensatz zu adulten Herzmuskelzellen (AG 2-4). Die Einzelwerte jeder Altersgruppe sind in Tabelle 7.1 dargestellt.

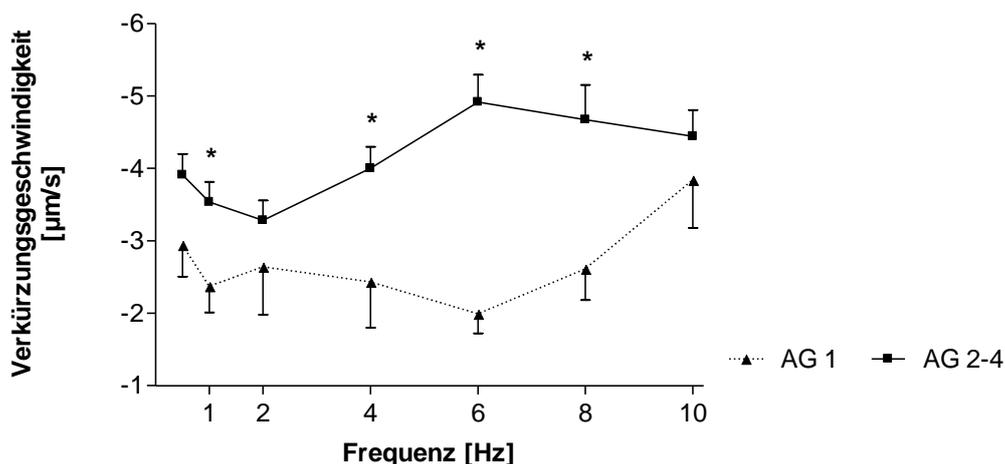


Abbildung 3.3: Verkürzungsgeschwindigkeits-Frequenz-Beziehung von juvenilen und adulten isolierten weiblichen Kardiomyozyten

Die negativen Werte der Verkürzungsgeschwindigkeit ergeben sich, da die Sarkomere kürzer werden. Kardiomyozyten der AG 1 verkürzten sich signifikant langsamer bei 1, 4, 6, und 8 Hz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6-20 Zellen, * $p < 0,05$.

Die Untersuchung der Relaxationsgeschwindigkeit zeigte ein gleichsinniges Verhalten (Abbildung 3.4). Junge Kardiomyozyten relaxierten langsamer als die Herzmuskelzellen erwachsener Mäuse. Die Unterschiede waren signifikant bei 1, 6 und 8 Hz. Die Relaxationsgeschwindigkeiten der einzelnen Altersgruppen sind in Tabelle 7.2 dargestellt.

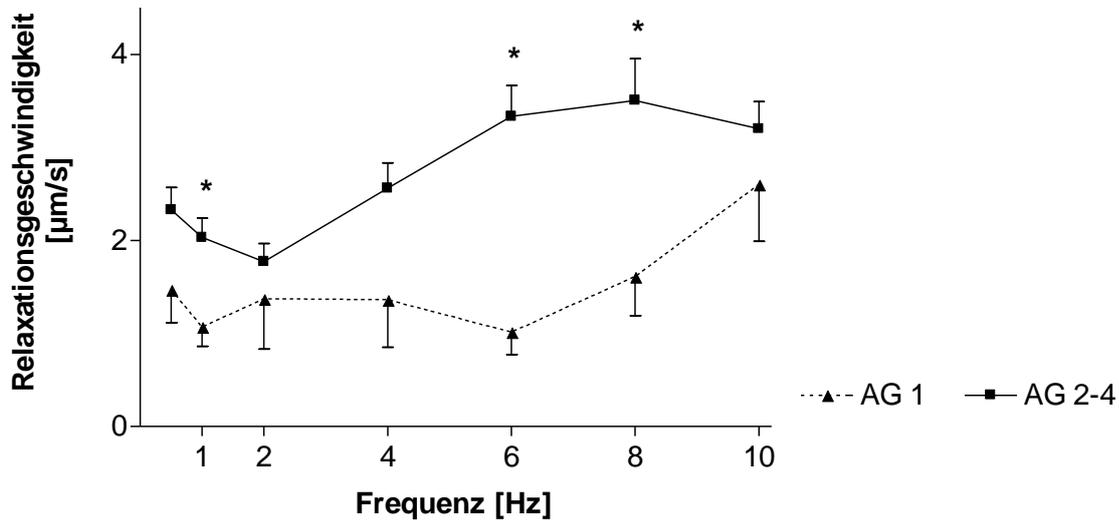


Abbildung 3.4: *Relaxationsgeschwindigkeits-Frequenz-Beziehung von juvenilen und adulten isolierten weiblichen Kardiomyozyten*

*Die positiven Werte ergeben sich, da die Sarkomerlänge zunimmt. Juvenile Herzmuskelzellen relaxierten langsamer als adulte Kardiomyozyten. Unterschiede sind signifikant bei 1, 6 und 8 Hz. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 6-20 Zellen, * $p < 0,05$.*

Die Verkürzungsdauer der Kardiomyozyten ist frequenzabhängig (Abbildung 3.5). Umso höher die Stimulationsfrequenz, desto kürzer ist die Verkürzungsdauer. Die Untersuchung der Verkürzungsdauer zeigte keine signifikanten Veränderungen. Einzeldaten aller Altersgruppen sind in Tabelle 7.3 aufgeführt.

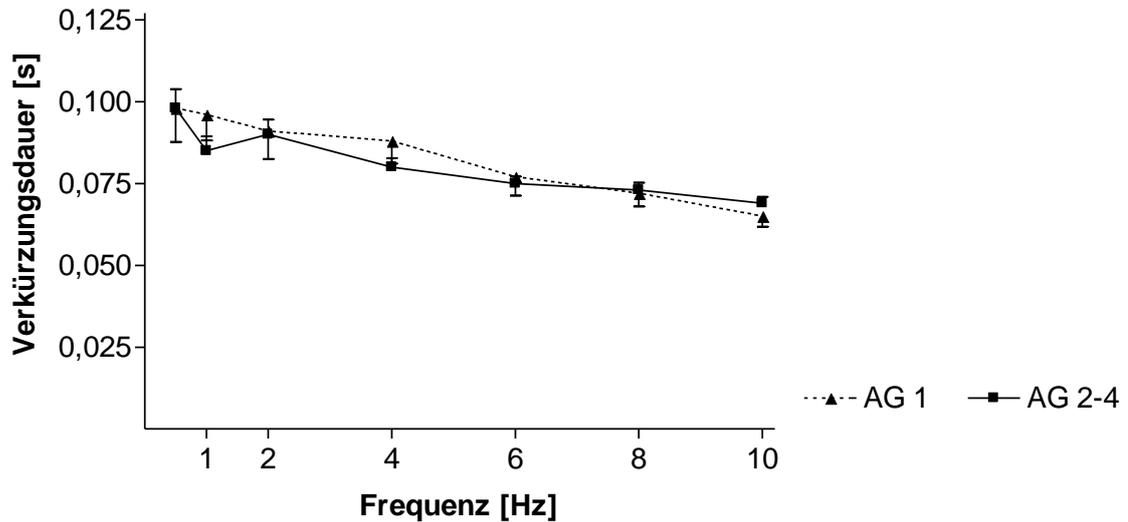


Abbildung 3.5: Verkürzungsdauer-Frequenz-Beziehung von juvenilen und adulten isolierten weiblichen Kardiomyozyten
Die Verkürzungsdauer unterschied sich nicht zwischen den Altersgruppen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6-20 Zellen, * $p < 0,05$.

3.1.1.2 Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause

Murine Kardiomyozyten zeigen ein frequenzabhängiges Sarkomerverkürzungsverhalten nach Stimulationspause. Die erste Verkürzung nach einer Stimulationspause, die „Post Rest“ Verkürzung, entwickelt eine relativ große Verkürzungsamplitude, die darauf folgenden Verkürzungen bilden eine negative oder positive Bowditch Herzterappe (Abbildung 3.6, A-C). Bei Frequenzen unter 6 Hz folgte auf die „Post Rest“ Verkürzung eine negative Herzterappe in allen Altersgruppen. Adulte Kardiomyozyten entwickelten eine positive Herzterappe bei 6, 8 und 10 Hz (Abbildung 3.6, B und C), junge Herzmuskelzellen nur bei 8 und 10 Hz.

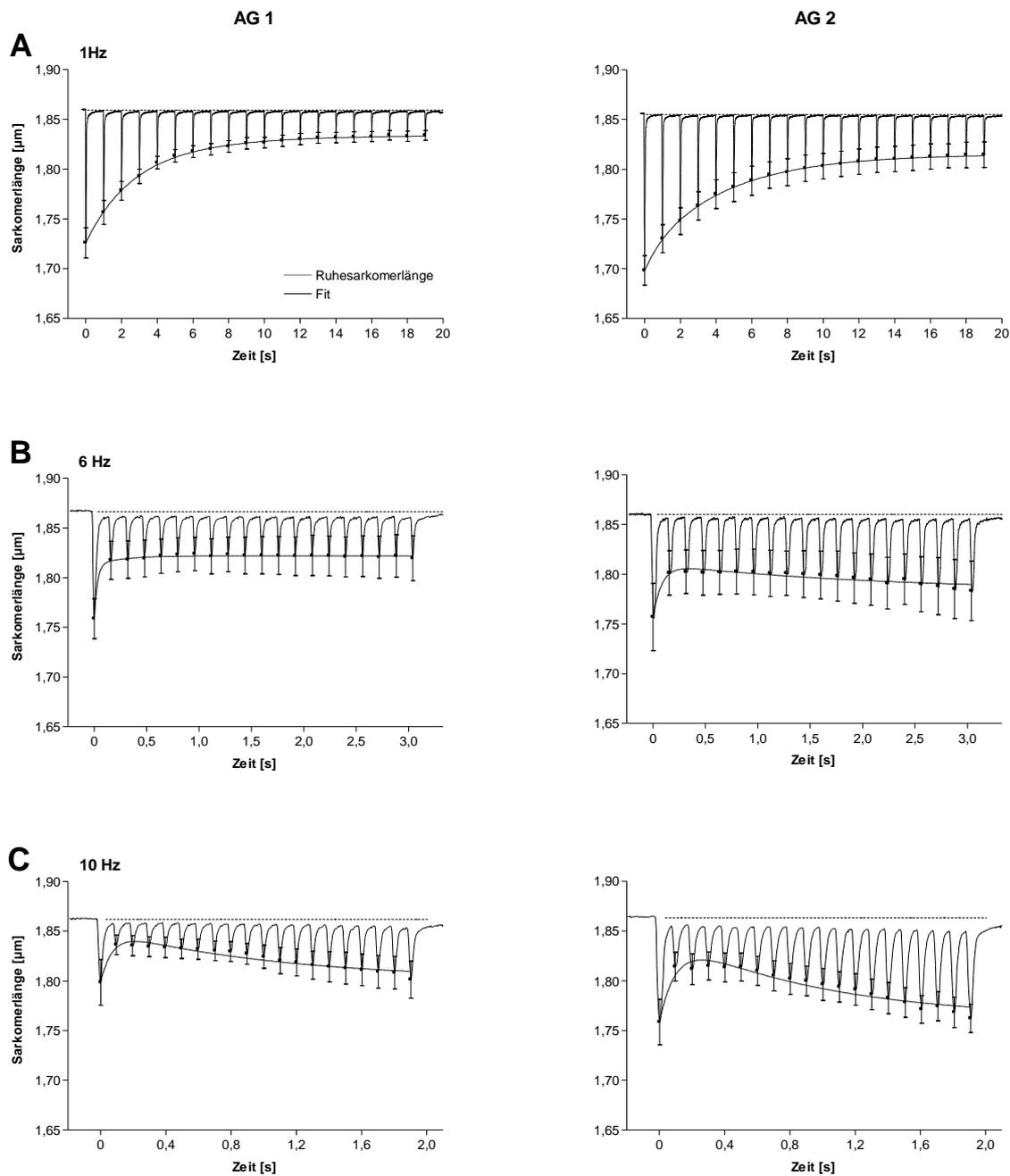


Abbildung 3.6: *Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause*

Gemittelte Sarkomerverkürzungen nach 30 Sekunden Stimulationspause bei 1 (A), 6 (B) und 10 Hz (C) Stimulationsfrequenz. Links sind Verkürzungen der Altersgruppe (AG) 1 und rechts der AG 2 dargestellt. Jeder Graph zeigt 20 Verkürzungen, daher sind die Zeitachsen unterschiedlich. An die mittleren Verkürzungsspitzenwerte \pm SEM wurde die Funktion 2.1 angepasst. A: AG 1, $n=10$, AG 2, $n=8$; B: AG 1 $n=6$, AG 2, $n=5$; C: AG 1, $n=6$, AG 2, $n=9$.

Die Zeitkonstante τ_1 beschreibt den Zeitverlauf der negativen Herzterre (Kapitel 2.3.4.2). Diese verringerte sich mit zunehmender Frequenz (Abbildung 3.7, A), z. B. in der AG 2 von 9,9 s bei 0,5 Hz auf 0,04 s bei 4 Hz. Der Zeitverlauf der negativen Herzterre unterschied sich nicht signifikant zwischen den Altersgruppen. Die Untersuchung der zweiten Zeitkonstante (τ_2 , Abbildung 3.7, B) ergab ebenfalls keine signifikanten Veränderungen bei 8 und 10 Hz. Jedoch bei 6 Hz bildeten juvenile Kardiomyozyten eine negative Herzterre im Gegensatz zu adulten Herzmuskelzellen. Die Einzelwerte jeder Altersgruppe sind in Tabelle 7.4 dargestellt.

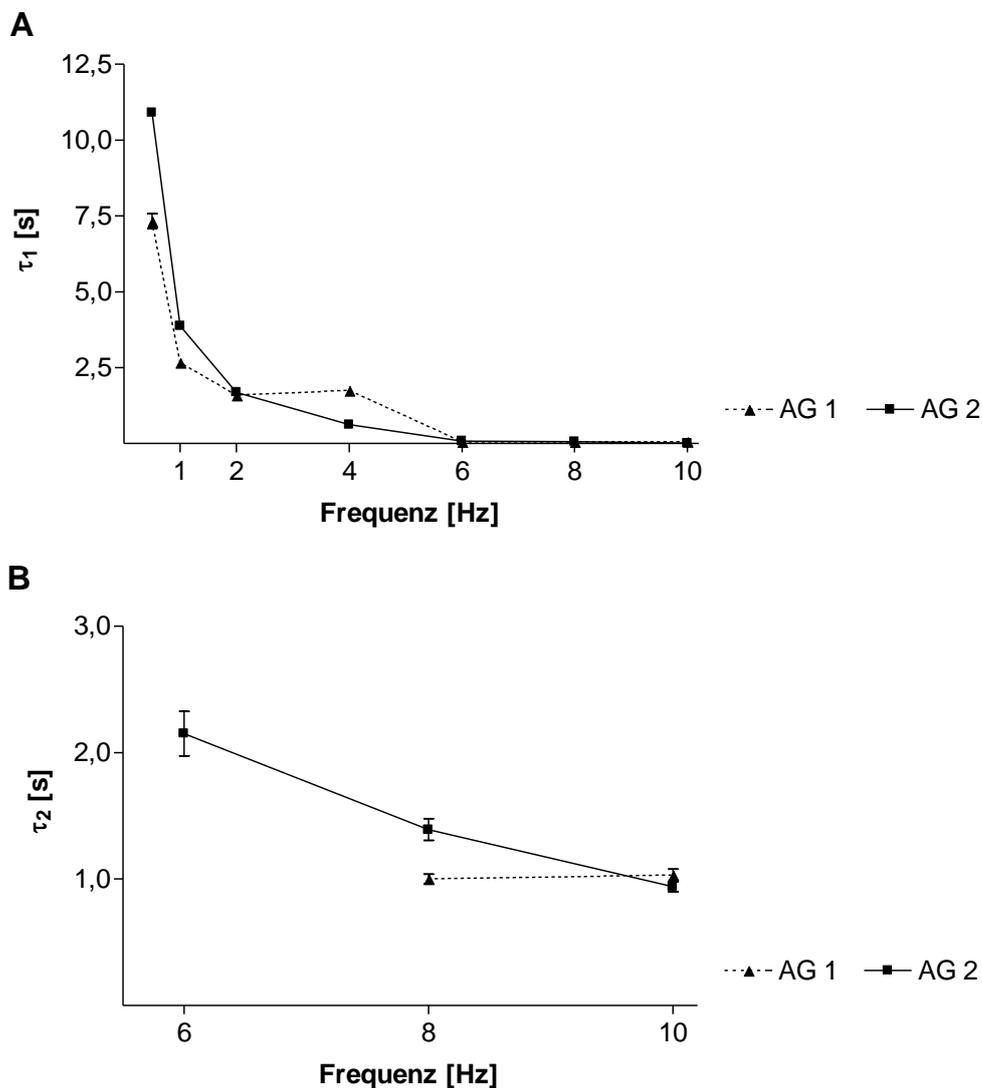


Abbildung 3.7: *Zeitverläufe der Herzterren von juvenilen und adulten Kardiomyozyten*
 Die erste (τ_1 , A) wie auch die zweite (τ_2 , B) Zeitkonstante (B) verkürzten sich mit zunehmender Frequenz. Juvenile Kardiomyozyten bildeten keine positive Herzterre und somit auch keine zweite Zeitkonstante bei 6 Hz Stimulationsfrequenz aus. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5-10 Zellen.

3.1.2 Untersuchungsergebnisse zum Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Sarkomerverkürzung

Die Ruhesarkomerlänge gemessen bei variierenden extrazellulären Calciumkonzentrationen lag zwischen 1,87 und 1,912 μm (0,9 mM Ca^{2+} : $1,912 \pm 0,053 \mu\text{m}$; 1,8 mM Ca^{2+} : $1,87 \pm 0,034 \mu\text{m}$; 3,6 mM Ca^{2+} : $1,887 \pm 0,033 \mu\text{m}$; 7,2 mM Ca^{2+} : $1,900 \pm 0,036 \mu\text{m}$, MW \pm SD). Ein linearer Zusammenhang zwischen steigender extrazellulärer Calciumkonzentration und Ruhesarkomerlänge konnte nicht beobachtet werden. Nur die Ruhesarkomerlänge bei 0,9 mM Ca^{2+} war im Vergleich zur Ruhesarkomerlänge bei 1,8 mM Ca^{2+} signifikant erhöht.

3.1.2.1 Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht

Die Kontraktion der Herzmuskelzelle ist von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängig. Eine biphasische Verkürzungs-Frequenz-Beziehung entwickelten die Kardiomyozyten nur bei 1,8 mM Ca^{2+} . Eine Erniedrigung der externen Calciumkonzentration (0,9 mM) resultierte in einer monophasischen Verkürzungs-Frequenz-Beziehung. Eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration führte zur Ausprägung einer triphasischen Verkürzungs-Frequenz-Beziehung. Bei 7,2 mM Ca^{2+} sank die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung nochmals ab 8 Hz Stimulationsfrequenz ab (Abbildung 3.8). Mit steigender Calciumkonzentration vergrößerten sich die Sarkomerverkürzungsamplituden in allen Frequenzbereichen (Abbildung 3.8 und Abbildung 3.). Ein multipler Mittelwertvergleich ergab signifikante Unterschiede in allen Frequenzbereichen zwischen nahezu allen Konzentrationen. Nur bei 2 und 8 Hz Stimulationsfrequenz unterschieden sich die Sarkomerverkürzungsamplituden von 0,9 und 1,8 mM nicht signifikant.

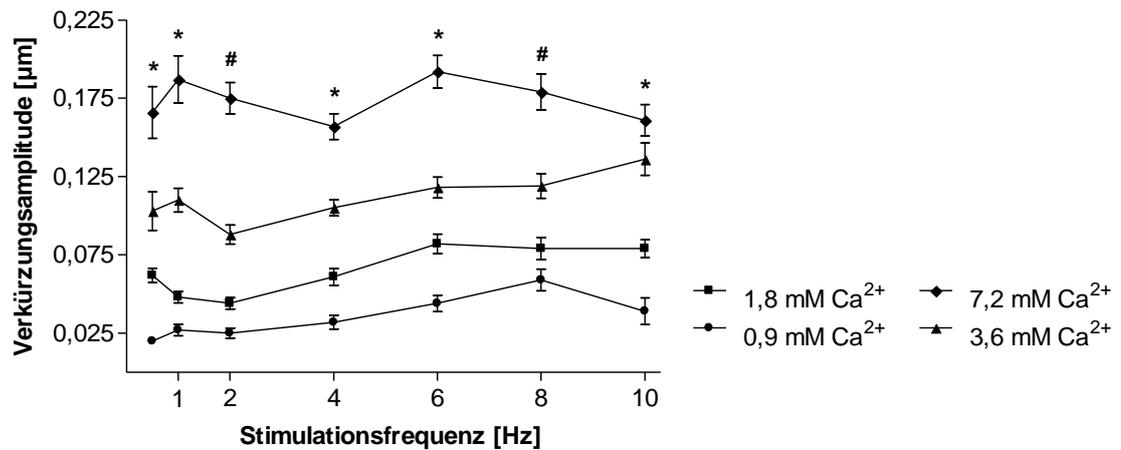


Abbildung 3.8: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung bei unterschiedlichen extrazellulären Calciumkonzentrationen

Mit steigender extrazellulärer Calciumkonzentration vergrößerten sich die Verkürzungsamplituden signifikant. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5-45 Zellen, * $p < 0,05$ im Vergleich zwischen allen Konzentrationen, # $p < 0,05$ im Vergleich zwischen allen Konzentrationen, außer zwischen 0,9 und 1,8 mM Ca²⁺.

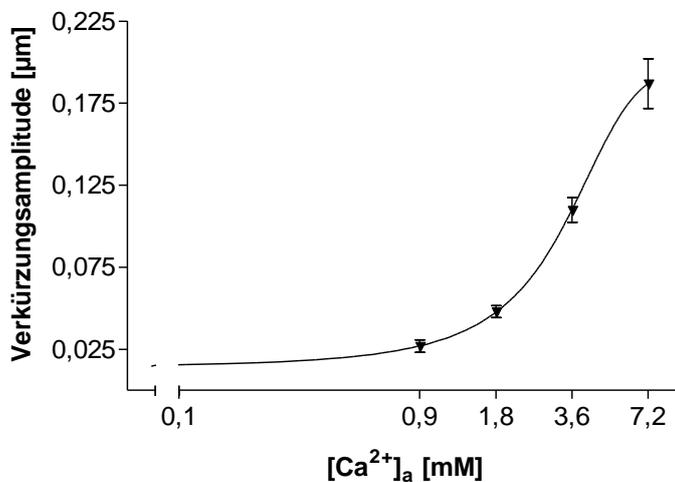


Abbildung 3.9: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der „Steady State“ Verkürzung bei 1 Hz Stimulationsfrequenz

Zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurde die „Steady State“ Verkürzung bei 1 Hz Stimulationsfrequenz gegen die aktuelle extrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_a$ aufgetragen. Die Abszisse ist logarithmisch dargestellt. Der EC50 Wert wird bei 3,28 mM $[Ca^{2+}]_a$ erreicht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 11-36 Zellen.

Die Werte der Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten zeigten ebenfalls ein von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängiges Verhalten (Abbildung 3.10). Umso höher die Calciumkonzentration, desto schneller verkürzten bzw. relaxierten die isolierten Kardiomyozyten. Die Verkürzungsgeschwindigkeit unterschied sich bei allen Stimulationsfrequenzen in allen Konzentrationen signifikant voneinander, außer bei 0,5 Hz (kein signifikanter Unterschied zwischen 0,9 und 1,8 mM) und 8 Hz (keine Signifikanz zwischen 1,8 und 3,6 mM). Der multiple Mittelwertvergleich der Relaxationsgeschwindigkeit war ebenso signifikant, mit Ausnahme der im Folgenden aufgeführten Vergleiche: 0,5 Hz: 0,9 mM vs. 1,8 mM; 2 Hz: 0,9 und 1,8 mM; 8 Hz: 0,9 und 1,8 mM; 10 Hz: 3,6 und 7,2 mM.

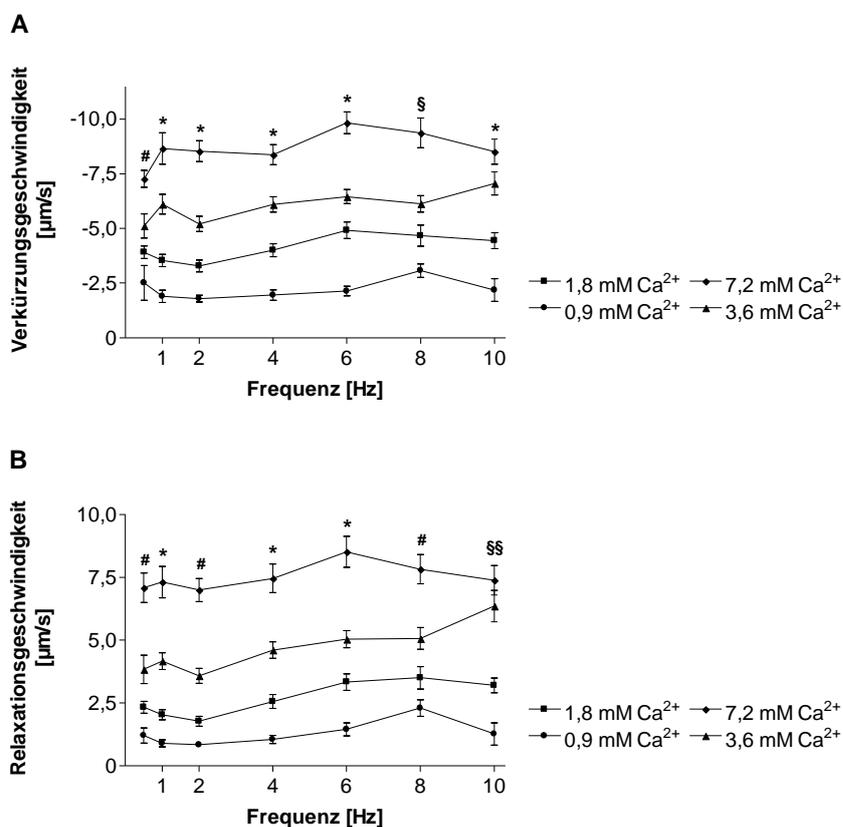


Abbildung 3.10: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeits-Frequenz-Beziehungen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen

Gemittelte Sarkomverkürzungsgeschwindigkeiten isolierter weiblicher Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur Frequenz. Mit steigender extrazellulärer Calciumkonzentration erhöhten sich die Sarkomverkürzungsgeschwindigkeiten in den meisten Frequenzbereichen signifikant. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5-45 Zellen, * $p < 0,05$ im Vergleich zwischen allen Konzentrationen, # $p < 0,05$ im Vergleich zwischen allen Konzentrationen, außer zwischen 0,9 und 1,8 mM Ca²⁺, § $p < 0,05$ im Vergleich zwischen allen Konzentrationen, außer zwischen 1,8 und 3,6 mM Ca²⁺, §§ $p < 0,05$ im Vergleich zwischen allen Konzentrationen, außer zwischen 3,6 und 7,2 mM Ca²⁺.

Wie schon in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben sinkt die Verkürzungsdauer mit steigender Frequenz. Dieses Verhalten zeigte sich auch hier wieder (Abbildung 3.11). Dabei konnte kein genereller Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Nur bei 4 und 6 Hz verlängerte sich die Verkürzungsdauer bei 0,9 mM Ca^{2+} im Vergleich zu den anderen Konzentrationen.

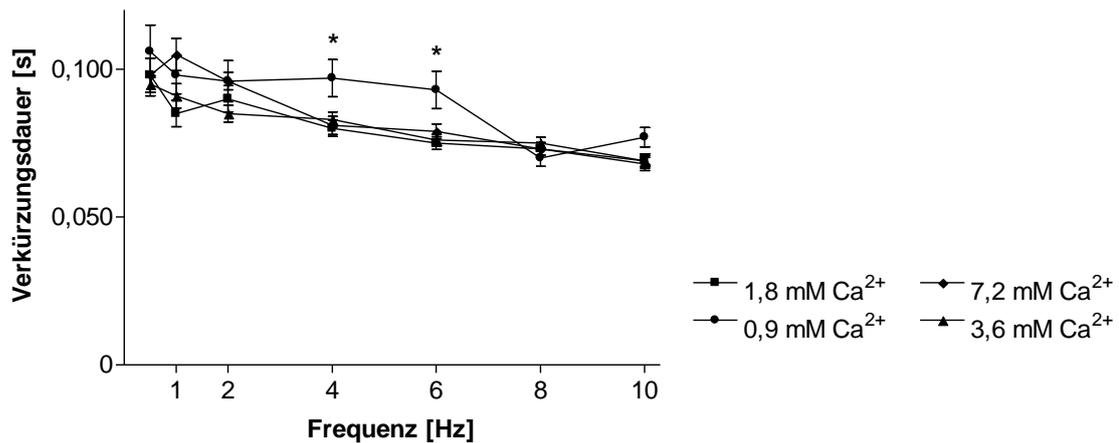


Abbildung 3.11: Verkürzungsdauer-Frequenz-Beziehung bei unterschiedlichen extrazellulärer Calciumkonzentrationen

Die Verkürzungsdauer wurde nicht durch die extrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst (außer: 0,9 mM Ca^{2+} 4 und 6 Hz). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5-45 Zellen, * $p < 0,05$.

3.1.2.2 Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause

Die extrazelluläre Calciumkonzentration übte nur einen geringen Einfluss auf das Verkürzungsverhalten der Herzmuskelzellen nach einer Stimulationspause aus. In allen Konzentrationsbereichen entwickelten die Kardiomyozyten eine negative Herzterappe im niedrigen Frequenzbereich (0,5–4 Hz). Eine positive Herzterappe bildeten Kardiomyozyten bei 6-10 Hz Stimulationsfrequenz und einer extrazellulären Calciumkonzentration von 1,8-7,2 mM. Bei 0,9 mM extrazellulärer Calciumkonzentration konnte eine positive Herzterappe erst ab 8 Hz Stimulationsfrequenz beobachtet werden (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13).

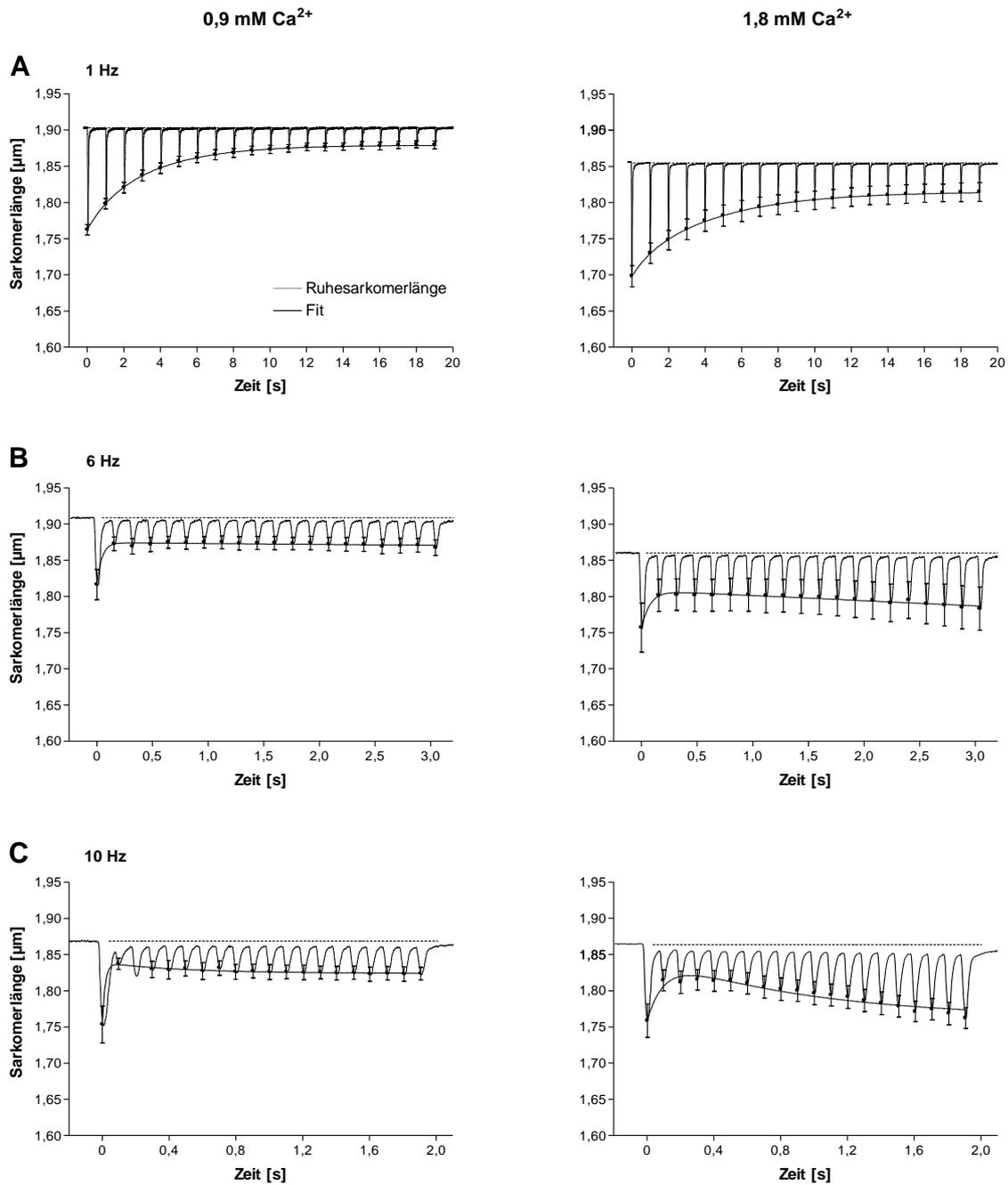


Abbildung 3.12: Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause gemessen bei 0,9 und 1,8 mM extrazellulären Calciumkonzentration

Gemittelte Sarkomerverkürzungen nach 30 Sekunden Stimulationspause bei 1 (A), 6 (B) und 10 Hz (C) Stimulationsfrequenz. Links sind Sarkomerverkürzungen bei 0,9 mM und rechts bei 1,8 mM extrazellulären Calciumkonzentration dargestellt. Jeder Graph zeigt 20 Verkürzungen, daher sind die Zeitachsen unterschiedlich. An die mittleren Verkürzungsspitzenwerte \pm SEM wurde die Funktion 2.1 angepasst. A: 0,9 mM Ca^{2+} , $n=9$, 1,8 mM Ca^{2+} , $n=8$; B: 0,9 mM Ca^{2+} , $n=10$, 1,8 mM Ca^{2+} , $n=5$; C: 0,9 mM Ca^{2+} , $n=7$, 1,8 mM Ca^{2+} , $n=9$.

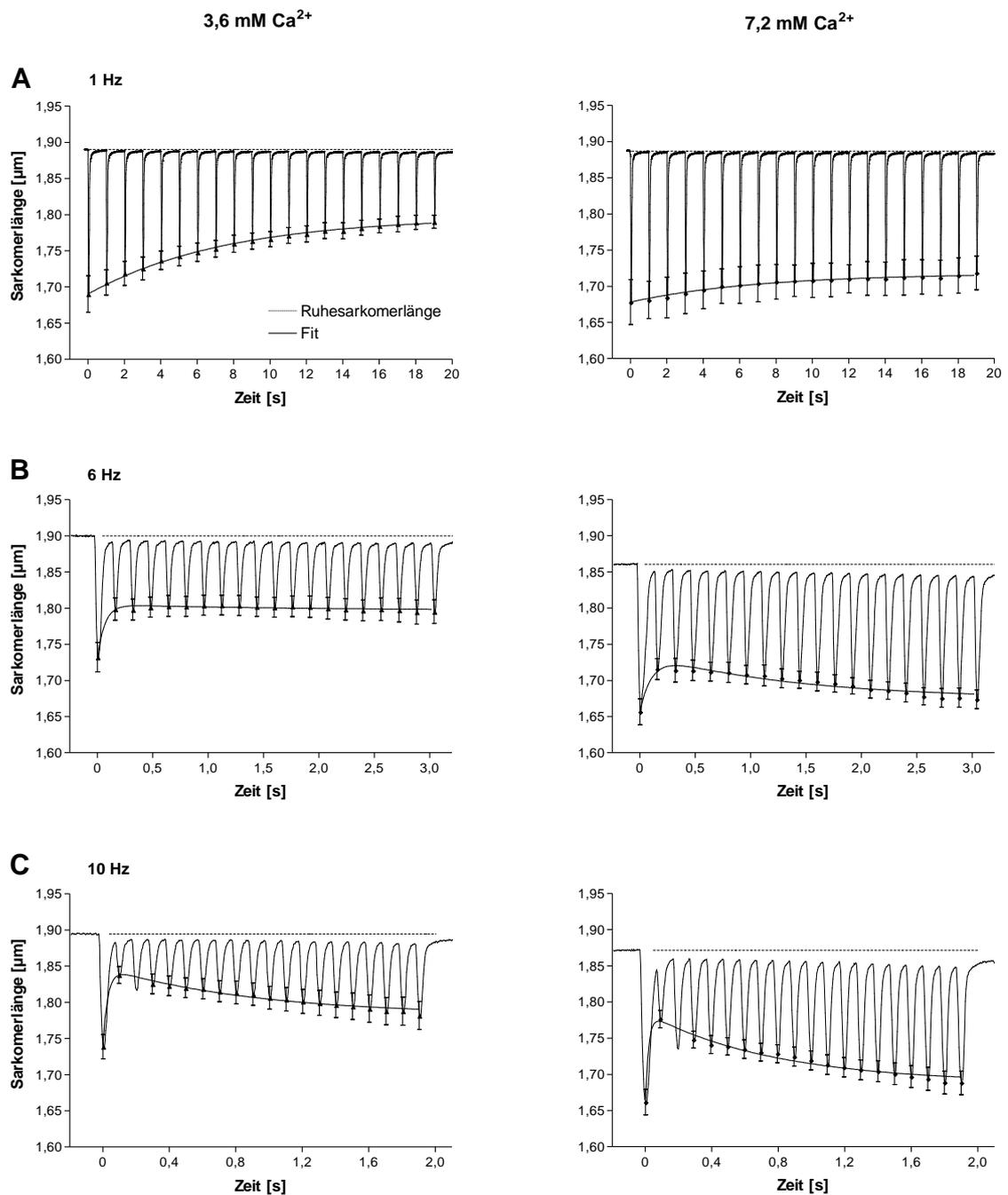


Abbildung 3.13: Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause gemessen bei 3,6 und 7,2 mM extrazellulärer Calciumkonzentration

Gemittelte Sarkomerverkürzungen nach 30 Sekunden Stimulationspause bei 1 (A), 6 (B) und 10 Hz (C) Stimulationsfrequenz. Links sind Verkürzungen bei 3,6 mM und rechts bei 7,2 mM extrazellulärer Calciumkonzentration dargestellt. Jeder Graph zeigt 20 Verkürzungen, daher sind die Zeitachsen unterschiedlich. An die mittleren Verkürzungsspitzenwerte \pm SEM wurde die Funktion 2.1 angepasst. A: 3,6 mM Ca^{2+} , $n=10$, 7,2 mM Ca^{2+} , $n=9$; B: 3,6 mM Ca^{2+} , $n=10$, 7,2 mM Ca^{2+} , $n=9$; C: 3,6 mM Ca^{2+} , $n=7$, 7,2 mM Ca^{2+} , $n=9$.

Unabhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration verkürzten sich sowohl die erste als auch zweite Zeitkonstante mit zunehmender Frequenz (Abbildung 3.14). Die extrazelluläre Calciumkonzentration führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Zeitverläufe der positiven und negativen Herztreppe, mit Ausnahme der fehlenden zweiten Zeitkonstante bei 0,9 mM extrazellulärer Calciumkonzentration.

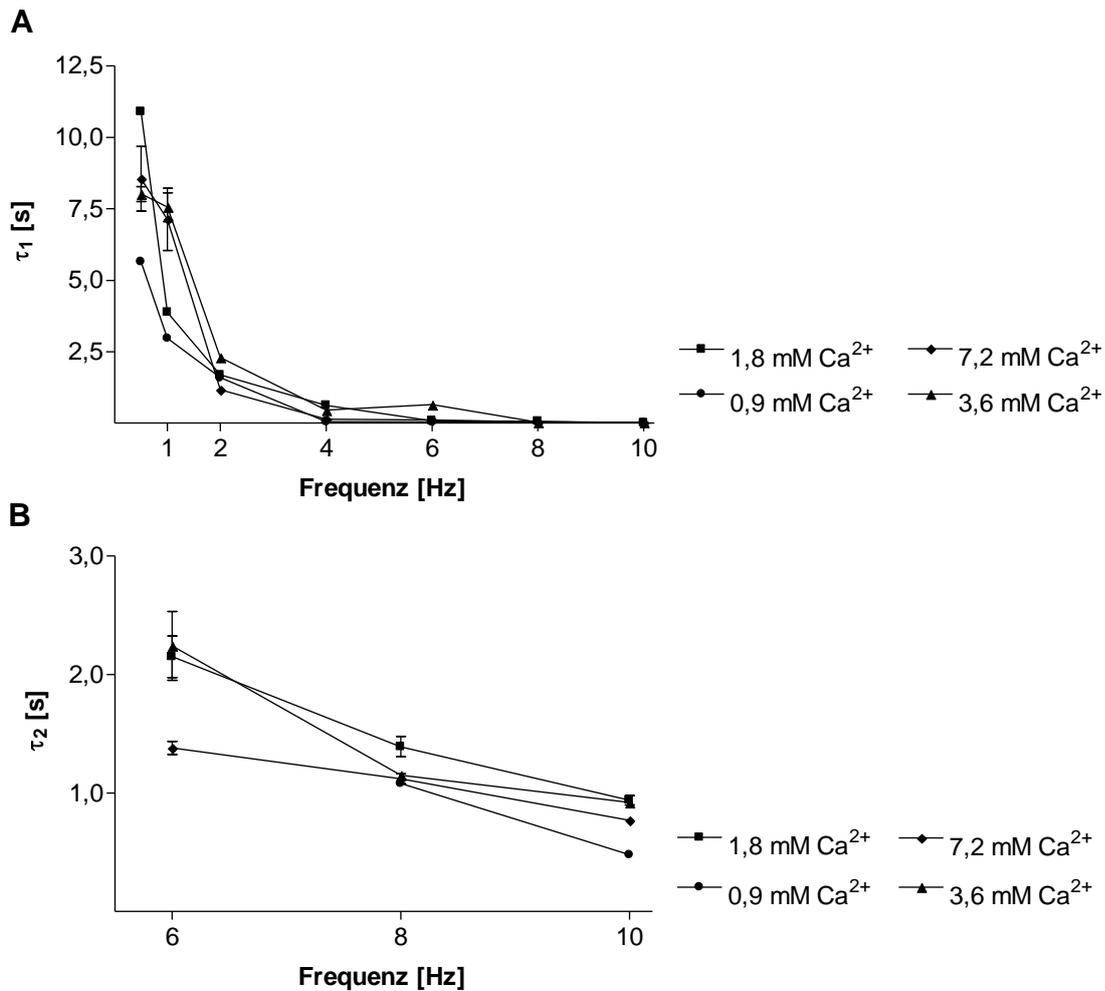


Abbildung 3.14: Zeitverläufe der Herztreppe bei variierenden extrazellulären Calciumkonzentrationen. Die erste (τ_1 , A) als auch die zweite (τ_2 , B) Zeitkonstante verkürzten sich mit zunehmender Frequenz. Die extrazelluläre Calciumkonzentration übte keinen signifikanten Einfluss auf die erste und zweite Zeitkonstante aus, mit Ausnahme der fehlenden zweiten Zeitkonstante bei 6 Hz bei 0,9 mM Ca^{2+} . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4-10 Zellen.

3.1.3 Einfluss des Östrogenrezeptors β auf die Sarkomerverkürzung isolierter weiblicher und männlicher Kardiomyozyten

Die Ruhesarkomerlänge von ER β $+/+$ und ER β $-/-$ Zellen variierte zwischen 1,81 und 1,87 μm (ER β KO, weiblich (w): $1,87 \pm 0,03 \mu\text{m}$; WT, w: $1,86 \pm 0,03 \mu\text{m}$; ER β KO, männlich (m): $1,83 \pm 0,06 \mu\text{m}$; WT, m: $1,81 \pm 0,05 \mu\text{m}$; MW \pm SD). Zwischen Kontroll- und ER β -defizienten Zellen beiderlei Geschlechts lagen keine signifikanten Unterschiede der Ruhesarkomerlänge vor. Jedoch waren die Werte weiblicher Zellen signifikant höher ($p < 0,01$) als die des entsprechenden Genotyps der männlichen Untersuchungsgruppe.

3.1.3.1 Sarkomerverkürzung im Gleichgewichtszustand

Weibliche und männliche ER β -defiziente Kardiomyozyten und die dazugehörigen WT Zellen verkürzten sich frequenzabhängig (Abbildung 3.15). Ihre Frequenz-Verkürzungs-Beziehung folgte dem bereits beschriebenen biphasischen Verlauf. Die minimale Verkürzungsamplitude lag bei 2 Hz in fast allen Gruppen, außer bei männlichen ER β KO Kardiomyozyten (6 Hz). In weiblichen Mäusen beeinflusste die ER β -Defizienz die Sarkomerverkürzung nur bei 10 Hz. Die ER β -defizienten Zellen wiesen hier eine signifikant höhere Verkürzungsamplitude auf. In männlichen Mäusen führte die ER β -Defizienz zu einer nicht signifikanten Abnahme der Verkürzungsamplitude bei 4 und 6 Hz Stimulationsfrequenz. Bei steigender Frequenz (8 und 10 Hz) glichen sich die Werte nahezu an.

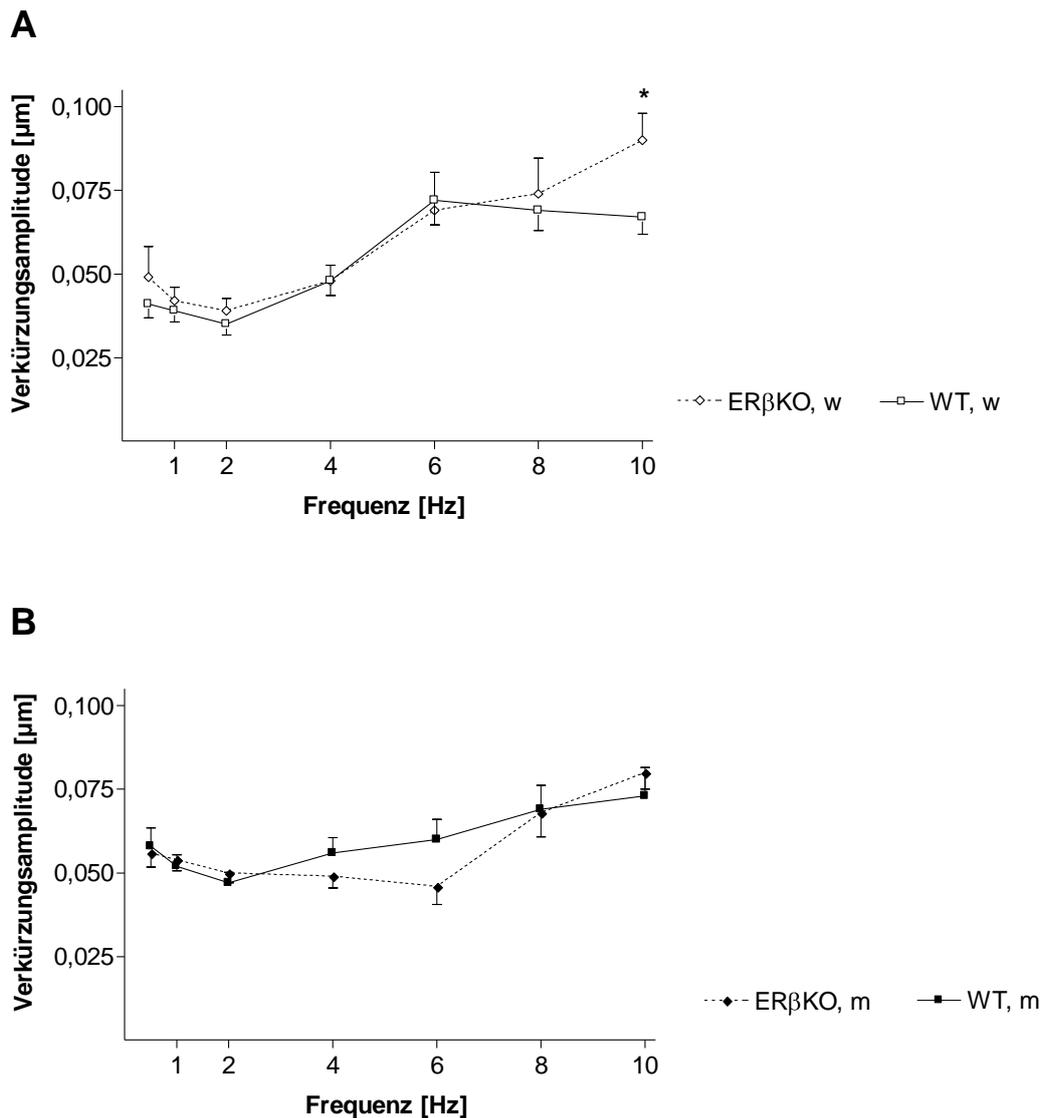


Abbildung 3.15: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung der ERβKO und WT Kardiomyozyten

Sarkomerverkürzungsamplituden von isolierten Kardiomyozyten weiblicher (A) und männlicher (B) ERβKO und WT Mäuse, Mittelwerte \pm SEM von 7-43 Zellen. Die ERβ-Defizienz übte außer bei 10 Hz in weiblichen Tieren keinen Einfluss auf die Sarkomerverkürzung aus, * $p < 0,05$.

Der Mittelwertvergleich der Sarkomerverkürzungsamplituden zwischen weiblichen und männlichen WT Kardiomyozyten ergab, dass im niedrigen Frequenzbereich (0,5 Hz-2 Hz) weibliche Zellen sich signifikant weniger verkürzen als männliche Zellen (Abbildung 3.16). Ab 4 Hz Stimulationsfrequenz sind keine signifikanten Unterschiede mehr zu erkennen.

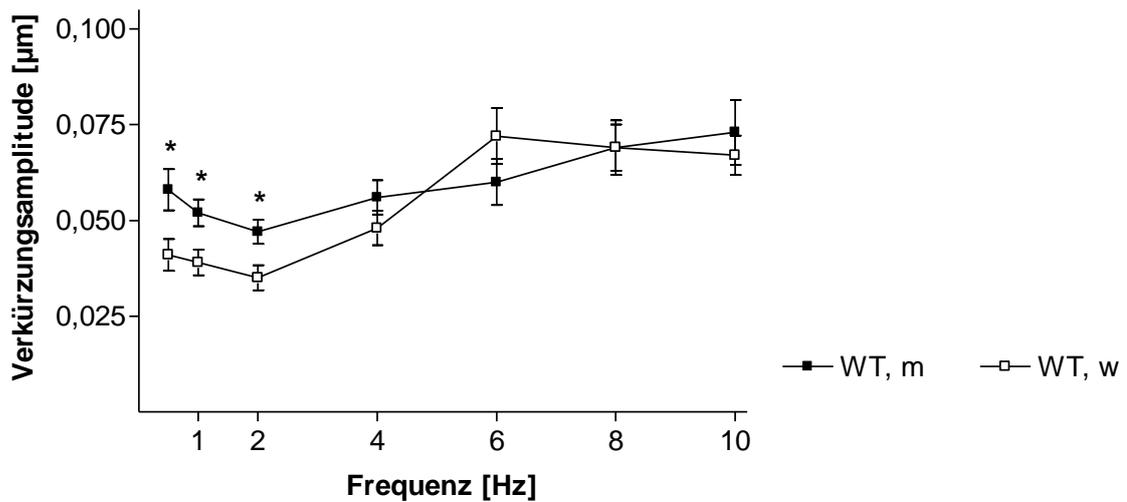


Abbildung 3.16: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung weiblicher und männlicher WT Kardiomyozyten
Sarkomerverkürzungsamplituden von isolierten Kardiomyozyten weiblicher und männlicher WT Mäuse, Mittelwerte \pm SEM von 11-37 Zellen. Männliche WT Zellen verkürzten sich im niedrigen Frequenzbereich signifikant stärker als Zellen von weiblichen WT Mäusen, * $p < 0,05$.

In männlichen Mäusen bewirkte das Fehlen des ER β keine signifikante Veränderung der Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit (Tabelle 7.5 und 7.6). In weiblichen Tieren beeinflusste das Fehlen des ER β nur bei 10 Hz die Verkürzungsgeschwindigkeiten (Tabelle 7.8 und Tabelle 7.9) signifikant ($p < 0,05$), die defizienten Zellen relaxierten (WT: $2,07 \pm 0,82 \mu\text{m/s}$; ER β KO: $3,23 \pm 1,18 \mu\text{m/s}$) und verkürzten sich (WT: $-3,53 \pm 1,22 \mu\text{m/s}$; ER β KO: $-5,22 \pm 1,61 \mu\text{m/s}$) schneller.

Zwischen 0,5 und 8 Hz übte die ER β -Defizienz keinen Einfluss auf die Verkürzungsdauer aus weder bei männlichen noch bei weiblichen Zellen (Tabelle 7.7 und Tabelle 7.10). Bei 10 Hz Stimulationsfrequenz wirkte sich ER β -Defizienz konträr aus: in männlichen Zellen verlängerte sich die Verkürzungsdauer signifikant ($p < 0,05$), in weiblichen hingegen lag eine signifikante Verminderung ($p < 0,05$) der Verkürzungsdauer vor (Tabelle 7.7 und Tabelle 7.10).

3.1.3.2 Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause

Nach einer Stimulationspause entwickelten ER β -defiziente und WT Zellen frequenzabhängig eine positive oder negative Herzterppe (Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18). Nur weibliche WT Zellen bildeten bei 6 Hz eine positive Herzterppe, die anderen Zellarten erst ab 8 Hz Stimulationsfrequenz.

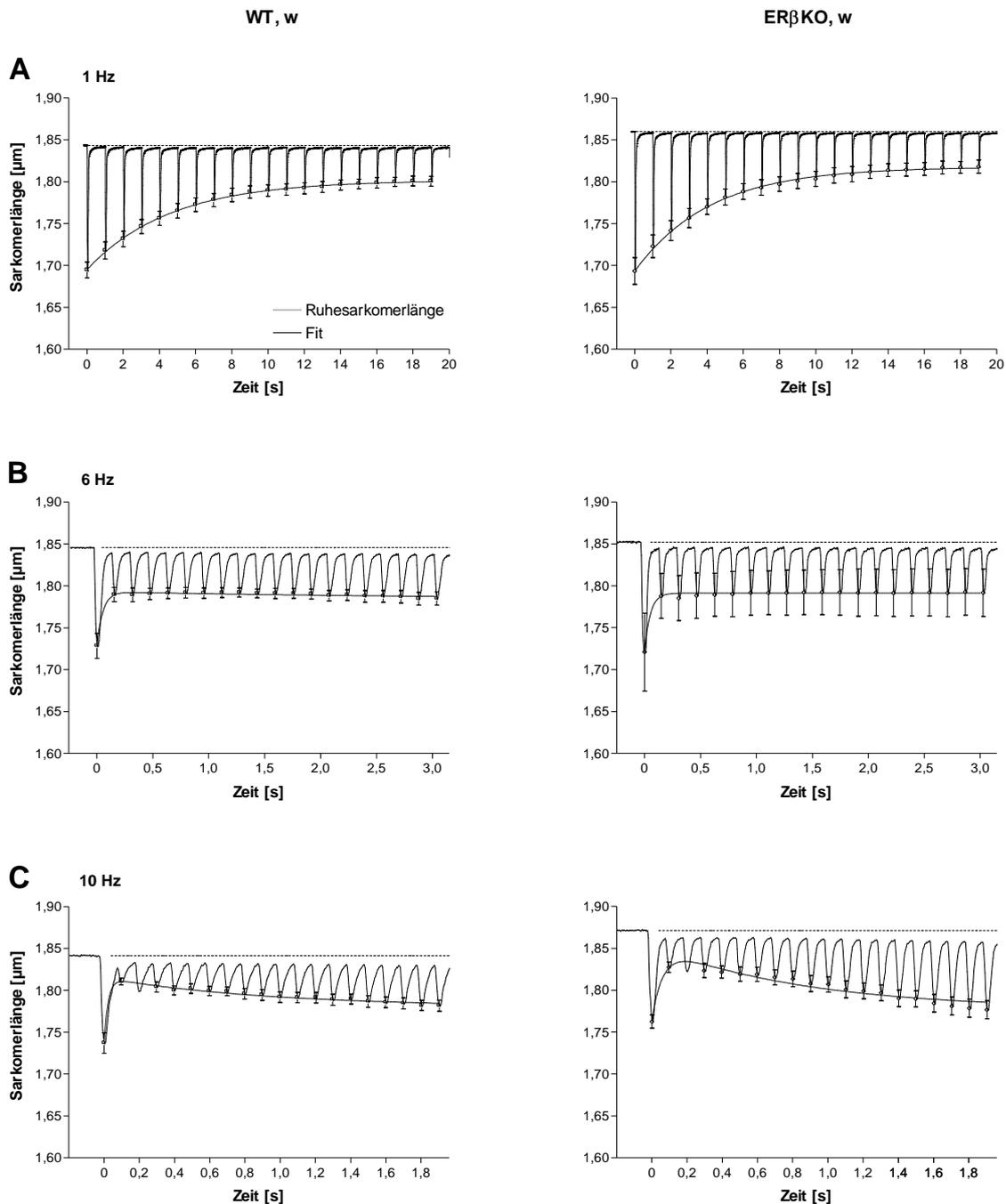


Abbildung 3.17: Sarkomerverkürzung weiblicher ER β KO und WT Kardiomyozyten nach Stimulationspause

Gemittelte Sarkomerverkürzungen nach 30 Sekunden Stimulationspause bei 1 (A), 6 (B) und 10 Hz (C) Stimulationsfrequenz. Links sind Verkürzungen weiblicher (w) Wildtyp (WT) und rechts weiblicher ER β KO Zellen dargestellt. Jeder Graph zeigt 20 Verkürzungen, daher sind die Zeitachsen unterschiedlich. An die mittleren Verkürzungsspitzenwerte \pm SEM wurde die Funktion 2.1 angepasst. A: WT, $n=10$, ER β KO, $n=10$; B: WT, $n=10$, ER β KO, $n=3$; C: WT, $n=9$, ER β KO, $n=6$.

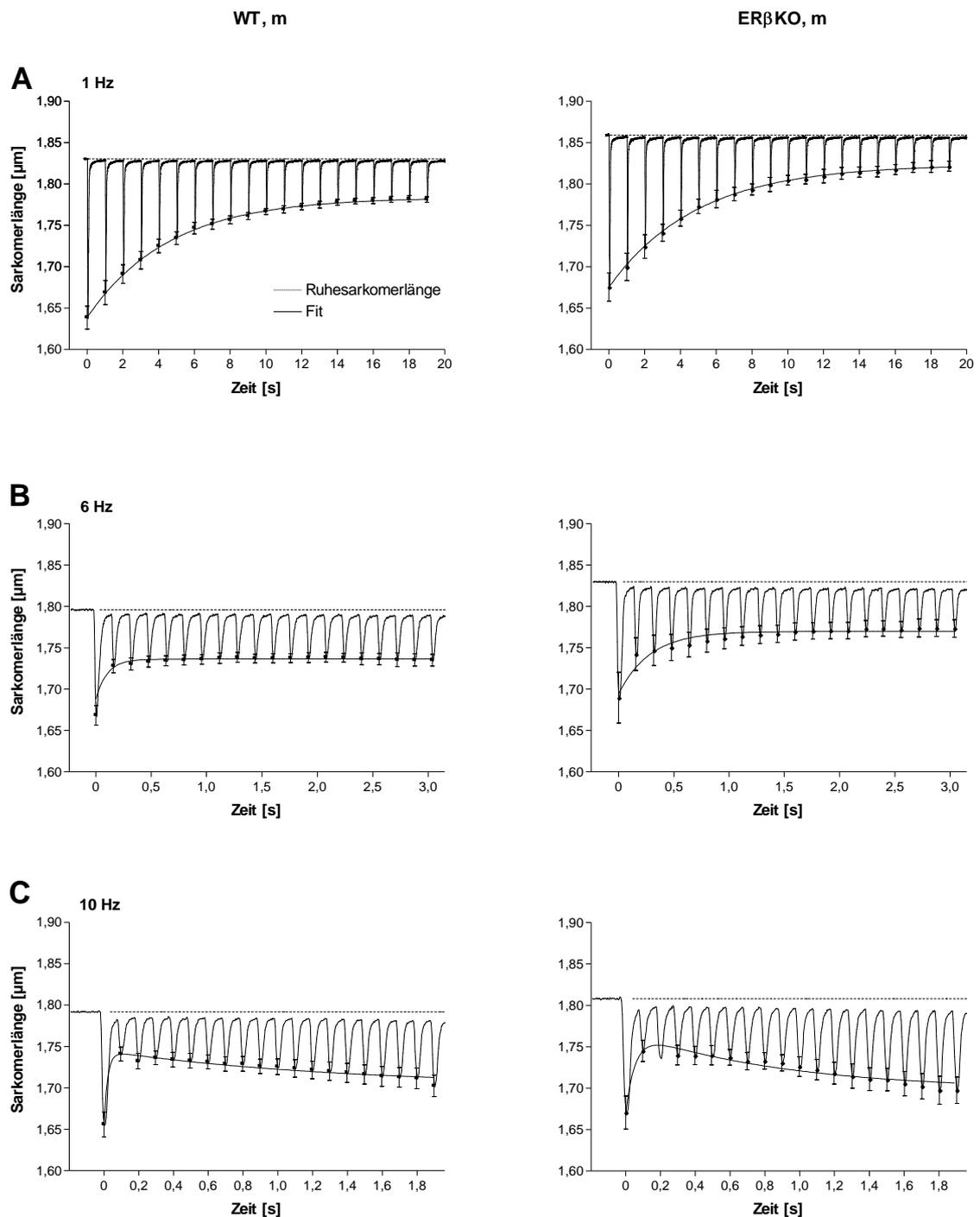


Abbildung 3.18: Sarkomerverkürzung männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten nach Stimulationspause

Gemittelte Sarkomerverkürzungen nach 30 Sekunden Stimulationspause bei 1 (A), 6 (B) und 10 Hz (C) Stimulationsfrequenz. Links sind Verkürzungen männlicher (m) Wildtyp (WT) und rechts männlicher ER β KO Zellen dargestellt. Jeder Graph zeigt 20 Verkürzungen, daher sind die Zeitachsen unterschiedlich. An die mittleren Verkürzungsspitzenwerte \pm SEM wurde die Funktion 2.1 angepasst. A: WT, n=10, ER β KO, n=10; B: WT n=8, ER β KO, n=7; C: WT, n=6, ER β KO, n=7.

τ_1 reduzierte sich in allen Gruppen mit zunehmender Frequenz (Abbildung 3.19). Der Mittelwertvergleich erhob signifikant erhöhte τ_1 Werte bei 0,5 Hz und 10 Hz in weiblichen ER β -defizienten Zellen, aber signifikant erniedrigte Werte bei 1, 2, 4, und 8 Hz. In männlichen ER β -defizienten Zellen waren die τ_1 Werte bei 1, 6 und 10 Hz signifikant erhöht und bei 4 Hz signifikant erniedrigt.

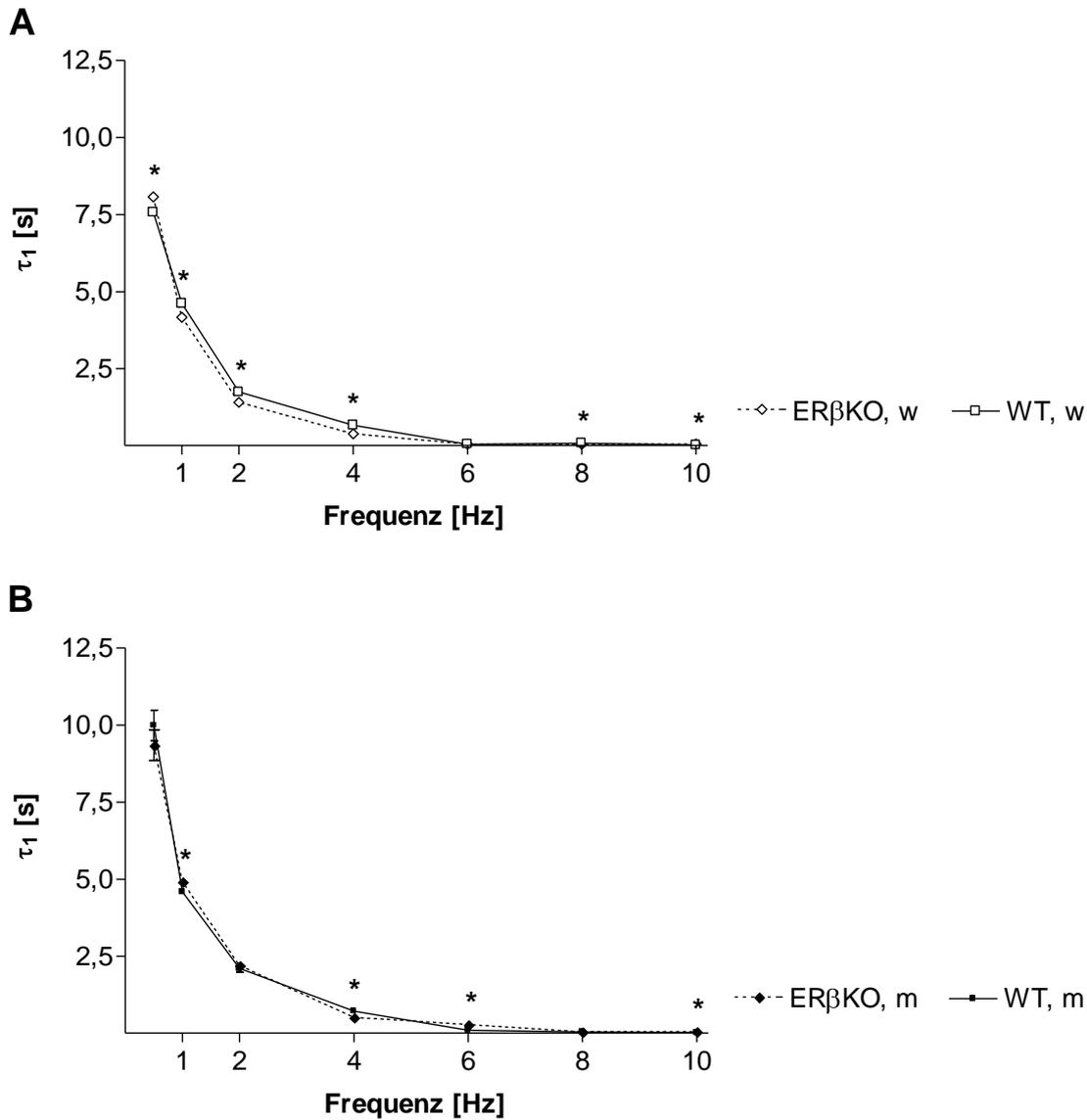


Abbildung 3.19: Zeitverläufe der Herztreppen weiblicher und männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

Die erste (τ_1) Zeitkonstanten der weiblichen (A) und männlichen (B) ER β KO und WT Kardiomyozyten verkürzten sich mit zunehmender Frequenz. Die ER β -Defizienz beeinflusste die erste Zeitkonstante in beiden Geschlechtern. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3-10 Zellen, * $p < 0,05$.

Die τ_2 Werte (8 und 10 Hz) unterschieden sich weder in der Gruppe der männlichen noch in der Gruppe der weiblichen Tiere (Abbildung 3.20). Bei 6 Hz Stimulationsfrequenz bildeten jedoch nur weibliche WT Zellen eine positive Herzterappe aus.

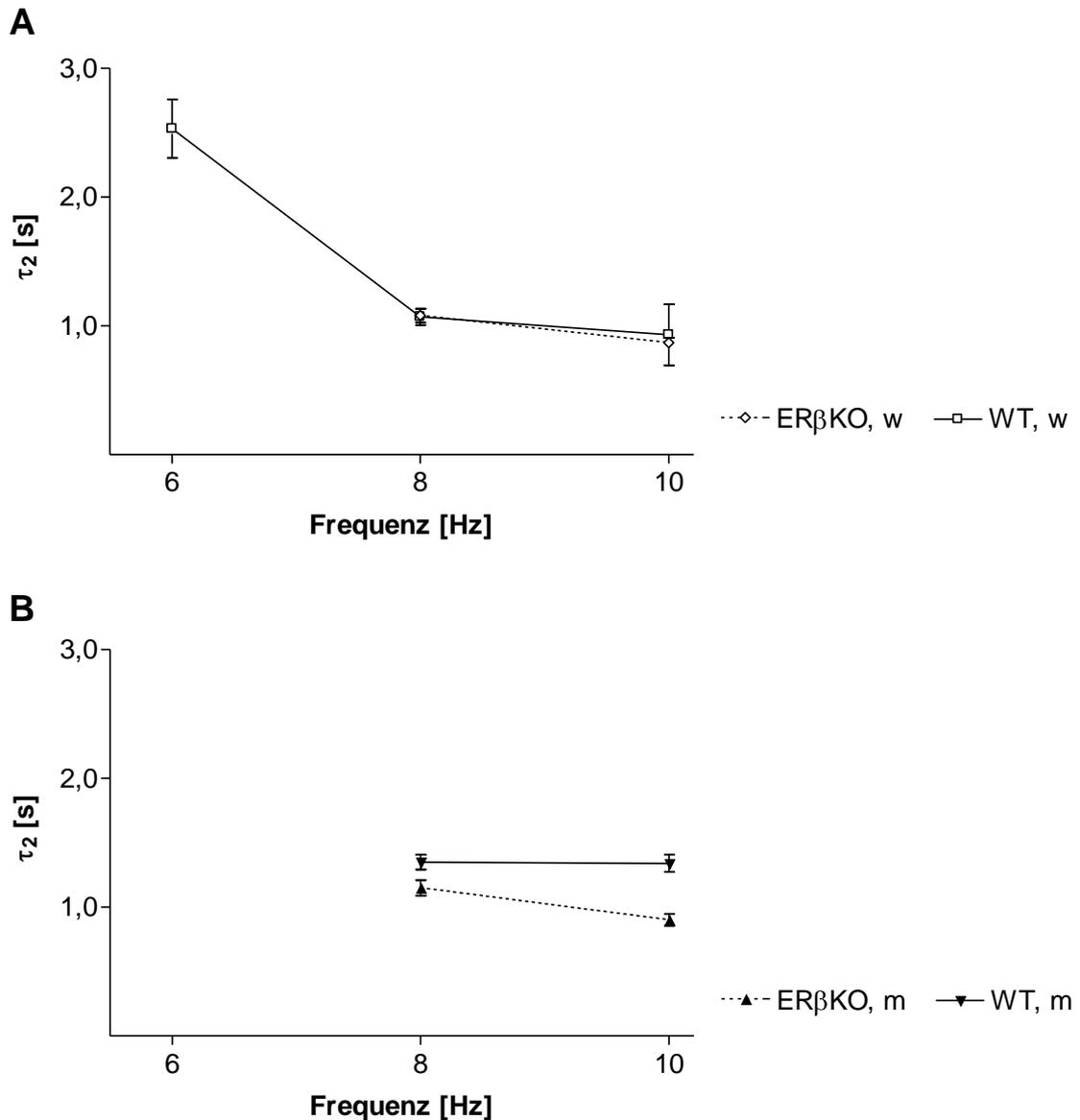


Abbildung 3.20: Zeitverläufe der Herztreppen weiblicher und männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

Die zweiten (τ_2) Zeitkonstanten der weiblichen (A) und männlichen (B) ER β KO und WT Kardiomyozyten unterschieden sich im Frequenzbereich zwischen 8 und 10 Hz nicht. Eine positive Herzterappe bei 6 Hz bildeten nur weibliche WT Zellen aus. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4-10 Zellen.

3.1.4 Einfluss des Östrogenrezeptors α auf die Sarkomerverkürzung

Die Ruhesarkomerlänge weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten variierte zwischen 1,84 und 1,87 μm (WT, w: $1,84 \pm 0,033 \mu\text{m}$, $n = 22$; ER α KO, w: $1,84 \pm 0,034 \mu\text{m}$, $n = 32$; WT, m: $1,87 \pm 0,046 \mu\text{m}$, $n = 51$; ER α KO, m: $1,84 \pm 0,035 \mu\text{m}$, $n = 42$). Diese war in männlichen WT Herzmuskelzellen signifikant erhöht ($p < 0,01$) in Vergleich zu allen anderen Gruppen.

3.1.4.1 Sarkomerverkürzung im Gleichgewicht

Weibliche und männliche Kontroll sowie weibliche ER α KO Zellen zeigten die beschriebene biphasische Verkürzungs-Frequenz-Beziehung mit einer minimalen Verkürzungsamplitude bei 2 Hz. Das Verkürzungs-Frequenzverhalten männlicher ER α KO Zellen hingegen war monophasisch mit minimalen Sarkomerverkürzungsamplituden bei 0,5 und 1 Hz (Abbildung 3.21). In beiden Geschlechtern konnten ER α vermittelte Änderungen beobachtet werden. Alle Verkürzungsamplituden von ER α KO Zellen waren im Vergleich zu denen der WT Kardiomyozyten vermindert. In den niedrigen Frequenzbereichen lagen signifikante Unterschiede in beiden Geschlechtern vor, in höheren Frequenzbereichen nur bei weiblichen Zellen (Abbildung 3.21).

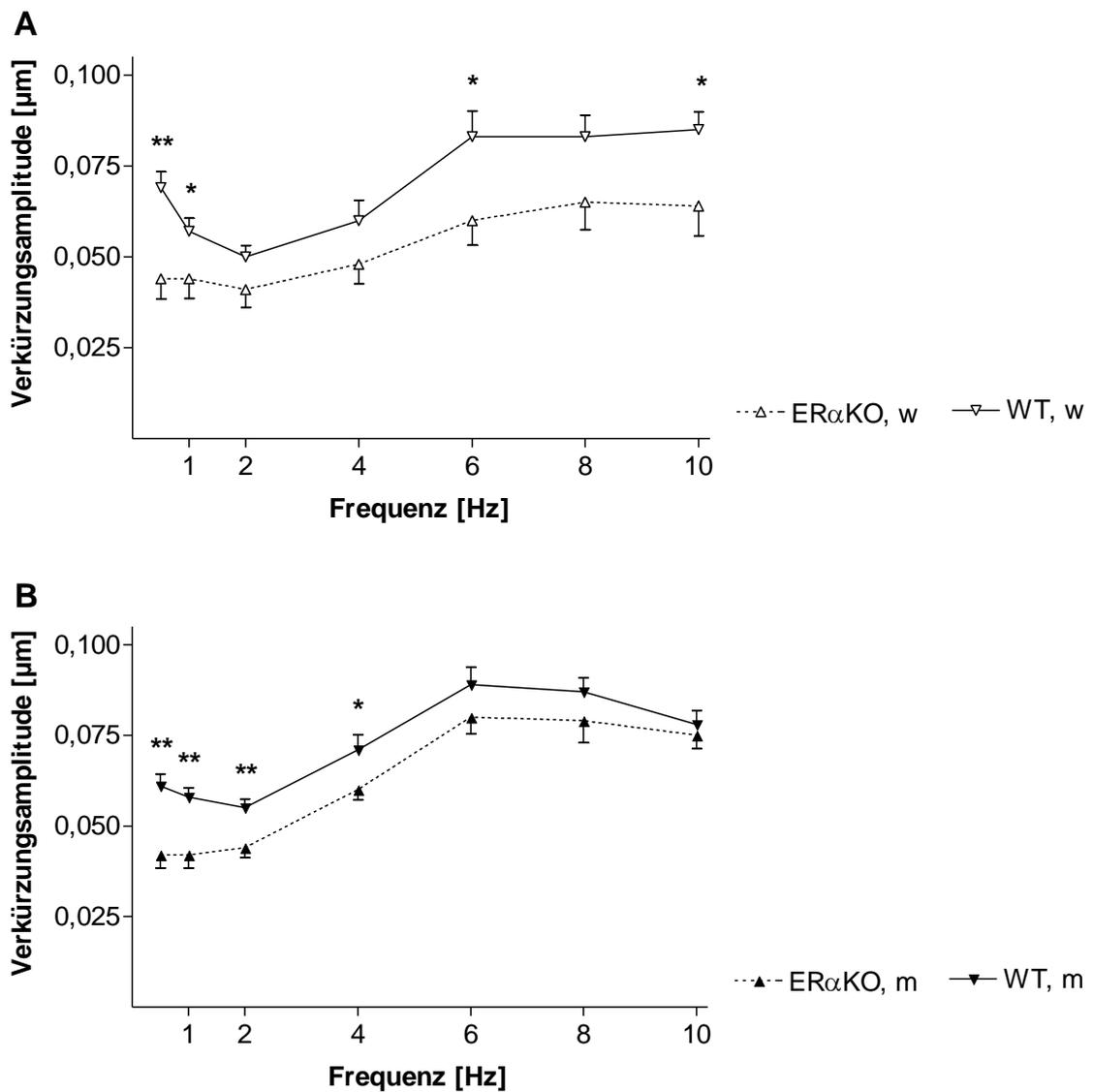


Abbildung 3.21: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Sarkomerverkürzungsamplituden von isolierten Kardiomyozyten weiblicher (A) und männlicher (B) ER α KO und WT Mäuse, Mittelwert \pm SEM von 17-69 Zellen. Die Verkürzungsamplituden der ER α -defizienten Zellen waren in beiden Geschlechtern in allen Frequenzbereichen vermindert, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Mittelwertvergleiche der Sarkomerverkürzungsamplituden zwischen weiblichen und männlichen WT Kardiomyozyten ergaben in keinem Frequenzbereich Unterschiede (Abbildung 3.22).

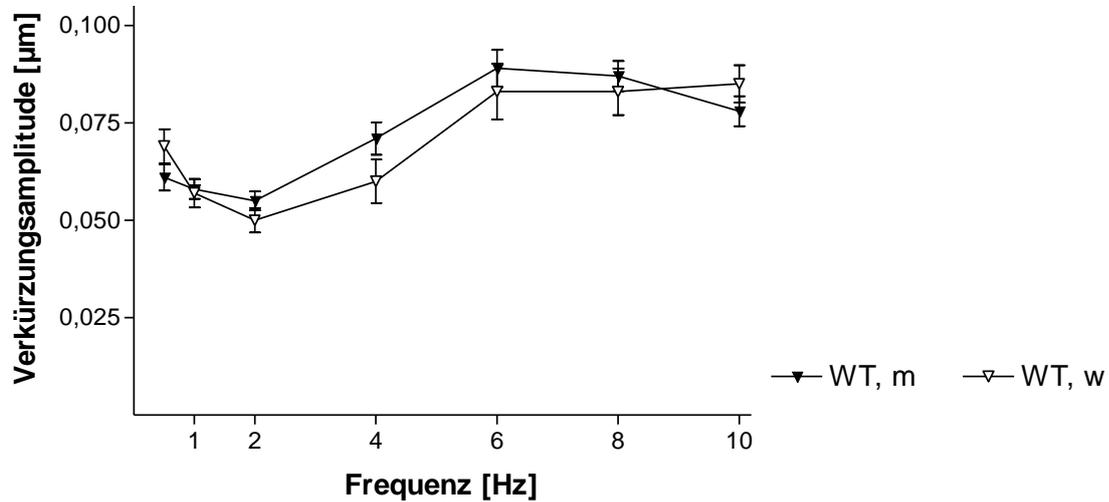


Abbildung 3.22: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung weiblicher und männlicher WT Kardiomyozyten
Sarkomerverkürzungsamplituden von isolierten Kardiomyozyten weiblicher und männlicher WT Mäuse, Mittelwerte \pm SEM von 19-69 Zellen. In keinem Frequenzbereich unterschieden sich die Sarkomerverkürzungsamplituden zwischen den Geschlechtern.

Die Verkürzungsgeschwindigkeit verhielt sich frequenzabhängig (Abbildung 3.23). In beiden Geschlechtern kontrahierten ER α KO Zellen langsamer. Signifikante Unterschiede wurden in der weiblichen Untersuchungsgruppe bei 8 Hz und in der männlichen Untersuchungsgruppe bei 0,5, 1, 2 und 6 Hz festgestellt.

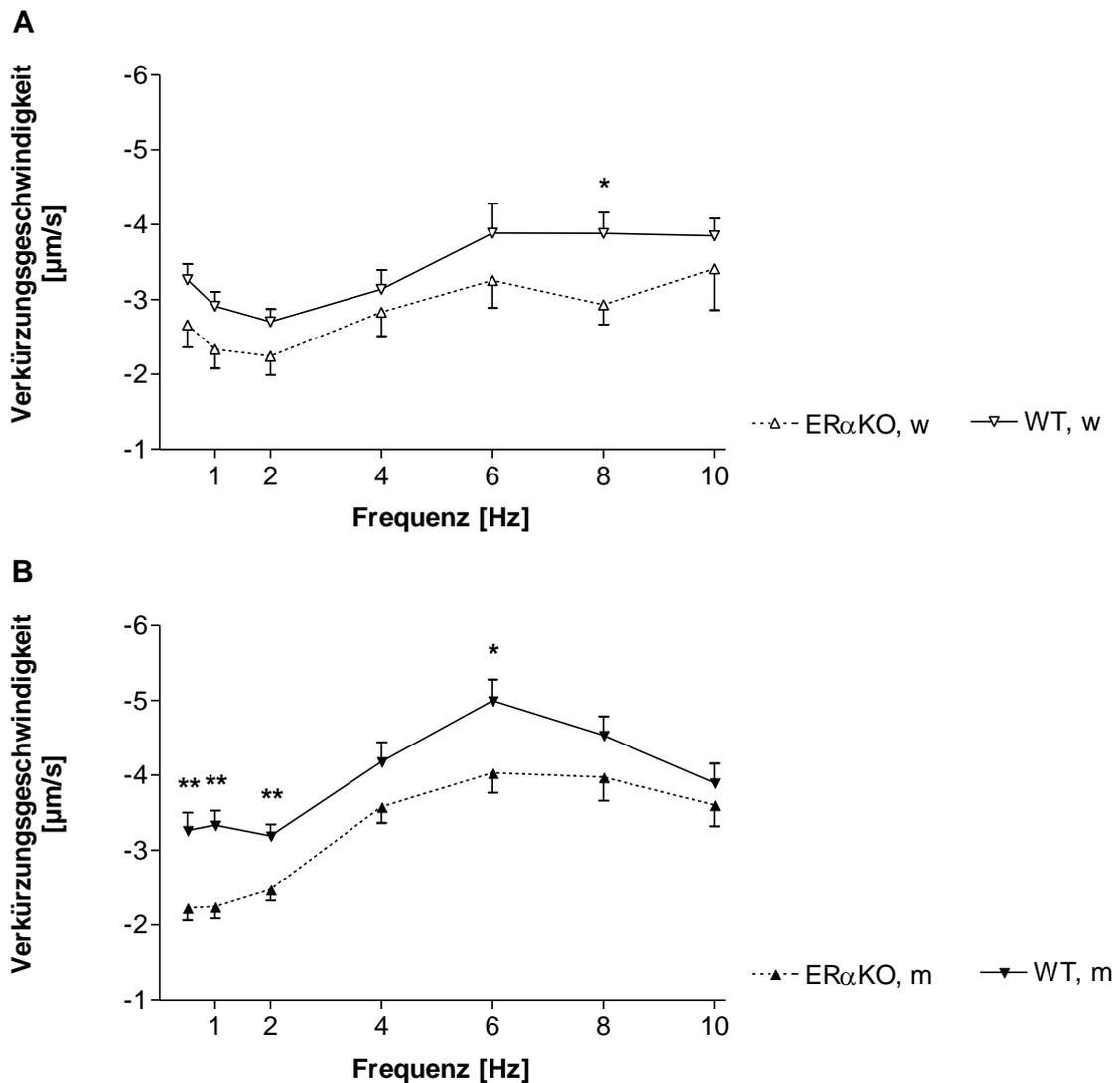


Abbildung 3.23: Verkürzungsgeschwindigkeits-Frequenz-Beziehung weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Verkürzungsgeschwindigkeit weiblicher (A) und männlicher (B) isolierter ER α KO und WT Kardiomyozyten, Mittelwerte \pm SEM von 17-69 Zellen. In allen Frequenzbereichen war die Verkürzungsgeschwindigkeit der ER α KO Zellen reduziert, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Die untersuchten Kardiomyozyten zeigten in der Relaxationsgeschwindigkeit eine ähnliche Frequenzabhängigkeit wie bei der Verkürzungsgeschwindigkeit (Abbildung 3.24). Das Ausschalten des ER α reduzierte die Relaxationsgeschwindigkeit in beiden Geschlechtern in allen Frequenzbereichen, außer bei 10 Hz Stimulationsfrequenz in männlichen Zellen. Signifikant waren die Unterschiede allerdings nur im niedrigen Frequenzbereich (w: 0,5 und 1 Hz; m: 0,5, 1 und 2 Hz).

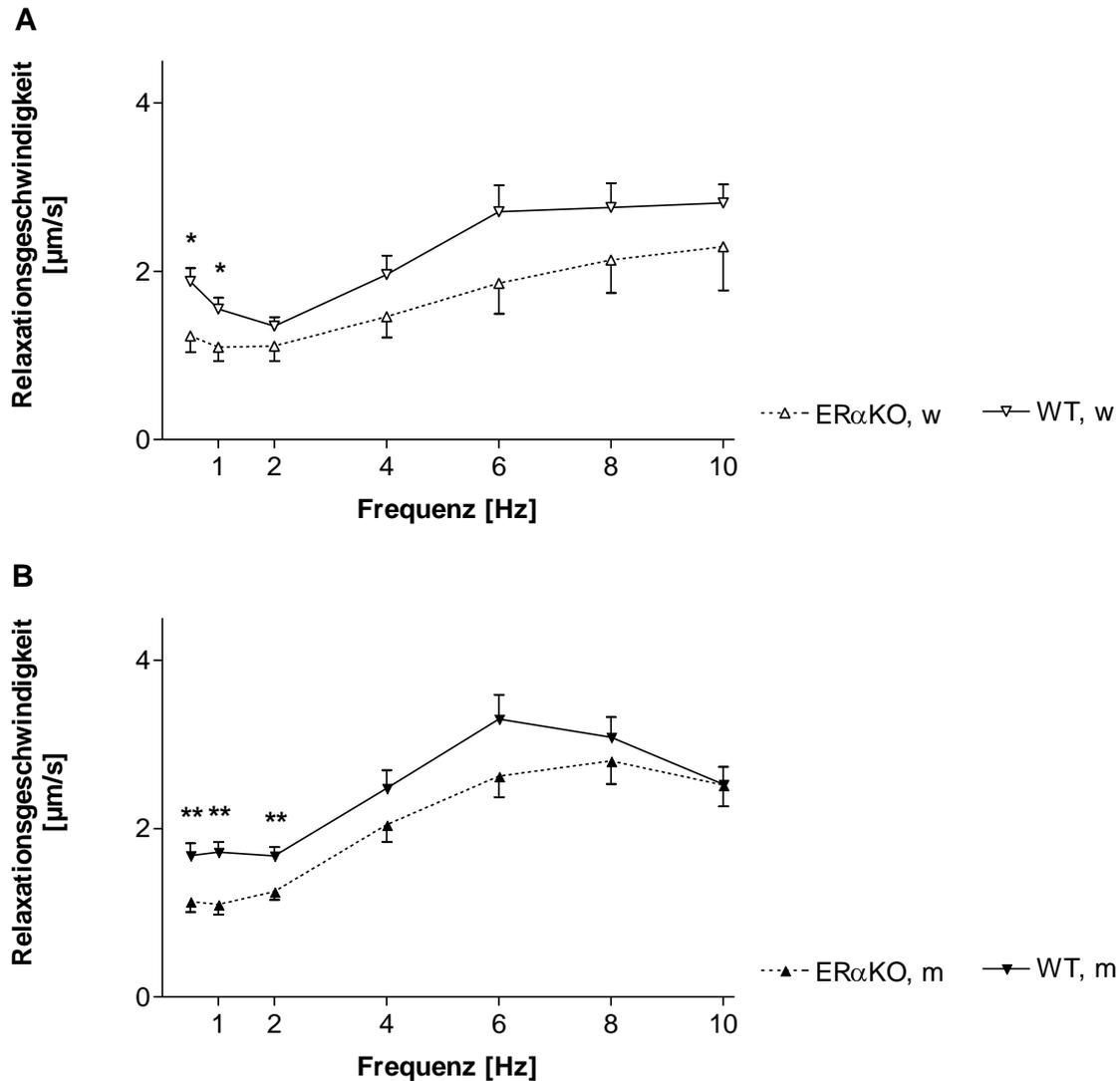


Abbildung 3.24: Relaxationsgeschwindigkeits-Frequenz-Beziehung weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Relaxationsgeschwindigkeit weiblicher (A) und männlicher (B) isolierter ER α KO und WT Kardiomyozyten, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 17-69 Zellen. In allen Frequenzbereichen war die Relaxationsgeschwindigkeit der ER α KO Zellen reduziert (Ausnahme: m, 10 Hz). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Die Verkürzungsdauer nahm wieder, wie schon beschrieben, mit zunehmender Stimulationsfrequenz ab (Abbildung 3.25). Umso höher die Stimulationsfrequenz, desto kürzer war die Verkürzungsdauer. In den niedrigen Frequenzbereichen (0,5-4 Hz) verlängerte die Ausschaltung des ER α in beiden Geschlechtern die Verkürzungsdauer. In weiblichen Zellen näherten sich die Werte bei 6 Hz und in männlichen Zellen bei 8 Hz aneinander an. Signifikante Unterschiede wurden nur für die männlichen Kardiomyozyten bei 0,5, 4 und 6 Hz erhoben.

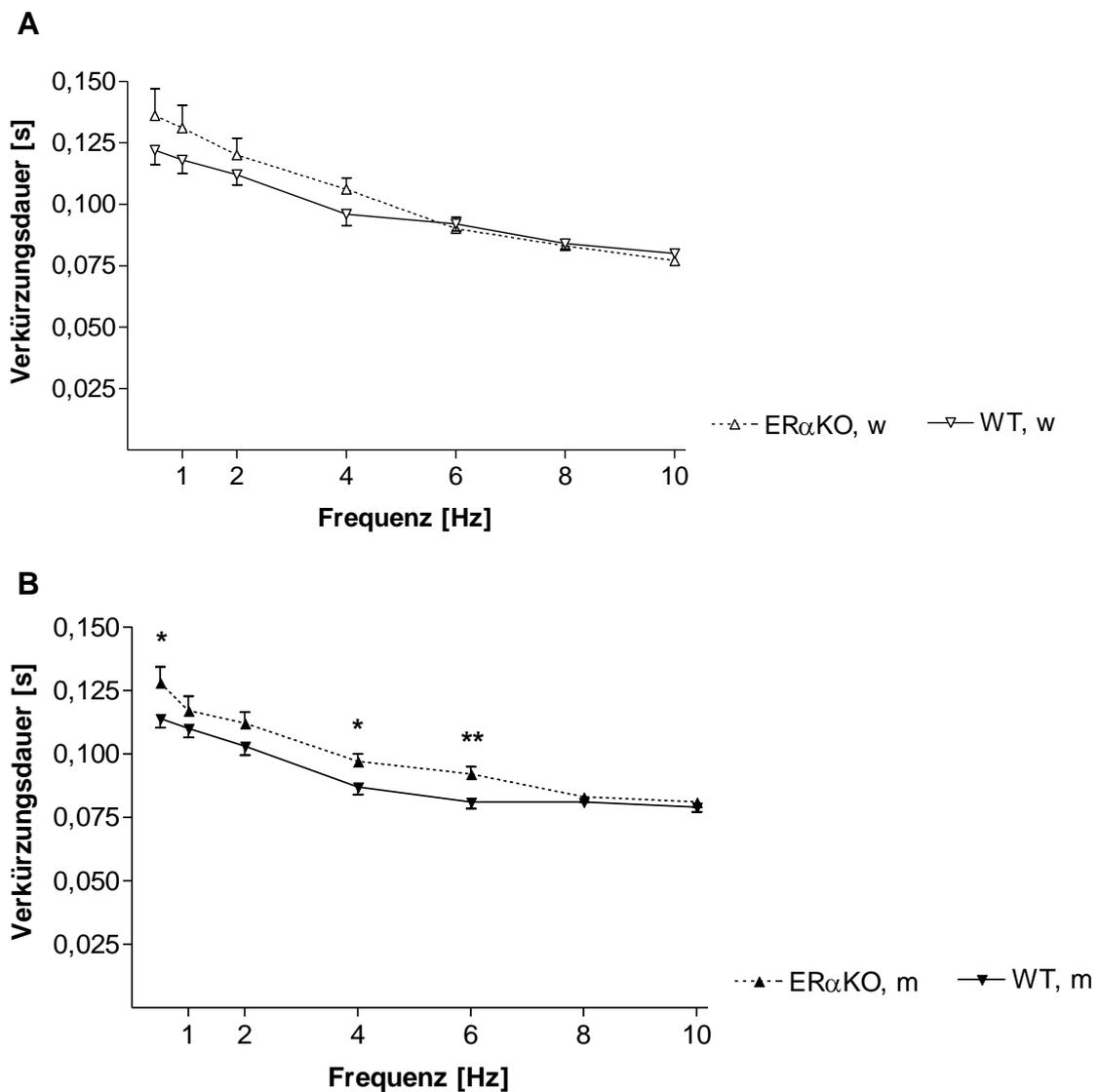


Abbildung 3.25: Verkürzungsdauer-Frequenz-Beziehung weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Verkürzungsdauer weiblicher (A) und männlicher (B) isolierter ER α KO und WT Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur Frequenz, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 17-69 Zellen. Die ER α -Defizienz verlängerte die Verkürzungsdauer nur im niedrigen Frequenzbereich, signifikant nur in männlichen Zellen. Die Werte assimilieren bei 6 Hz in der weiblichen und bei 8 Hz in der männlichen Gruppe. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.4.2 Sarkomerverkürzung nach Stimulationspause

Sowohl ER α KO als auch WT Zellen beiderlei Geschlechts entwickelten nach einer Stimulationspause frequenzabhängig eine positive oder negative Bowditch Herztreppe (Kapitel 3.1.1.2). Die männlichen Kardiomyozyten und die weiblichen WT Zellen bildeten eine positive Herztreppe bei 6, 8 und 10 Hz, weibliche ER α KO Zellen nur bei 8 und 10 Hz (Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27). Die in Abbildung 3.27 sichtbare Verringerung der Ruhesarkomerlänge bei den männlichen ER α KO Zellen im Vergleich zu den Werten der männlichen WT Zellen entspricht den in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Unterschieden.

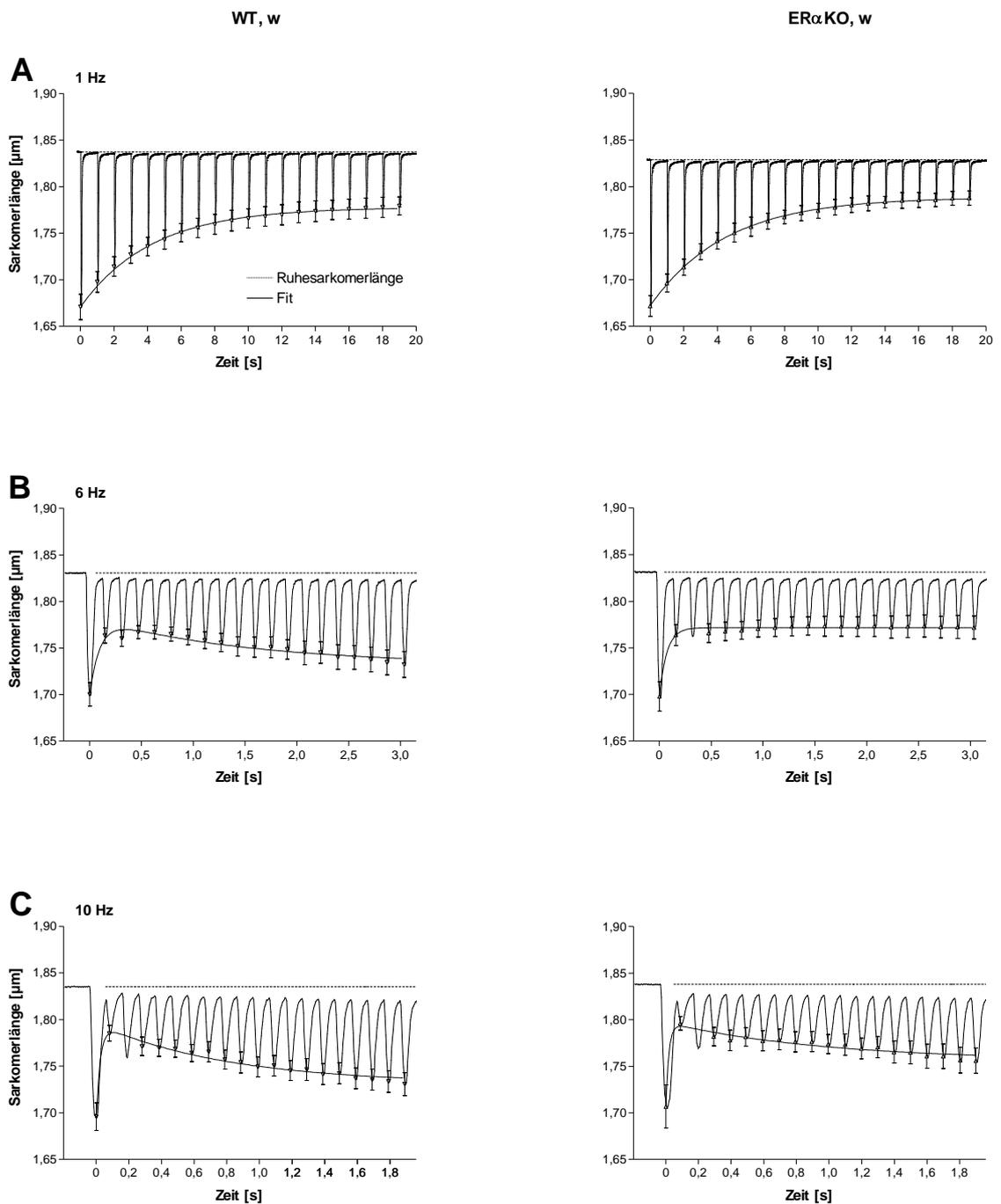


Abbildung 3.26: Sarkomerverkürzung weiblicher ER α KO und WT Zellen nach Stimulationspause
 Gemittelte Sarkomerverkürzungen nach 30 Sekunden Stimulationspause bei 1 (A), 6 (B) und 10 Hz (C) Stimulationsfrequenz. Links sind Verkürzungen weiblicher (w) WT und rechts weiblicher ER α KO Zellen dargestellt. Jeder Graph zeigt 20 Verkürzungen, daher sind die Zeitachsen unterschiedlich. An die mittleren Verkürzungsspitzenwerte \pm SEM wurde die Funktion 2.1 angepasst. A: WT, $n=10$, ER α KO, $n=10$; B: WT, $n=10$, ER α KO, $n=10$; C: WT, $n=10$, ER α KO, $n=4$.

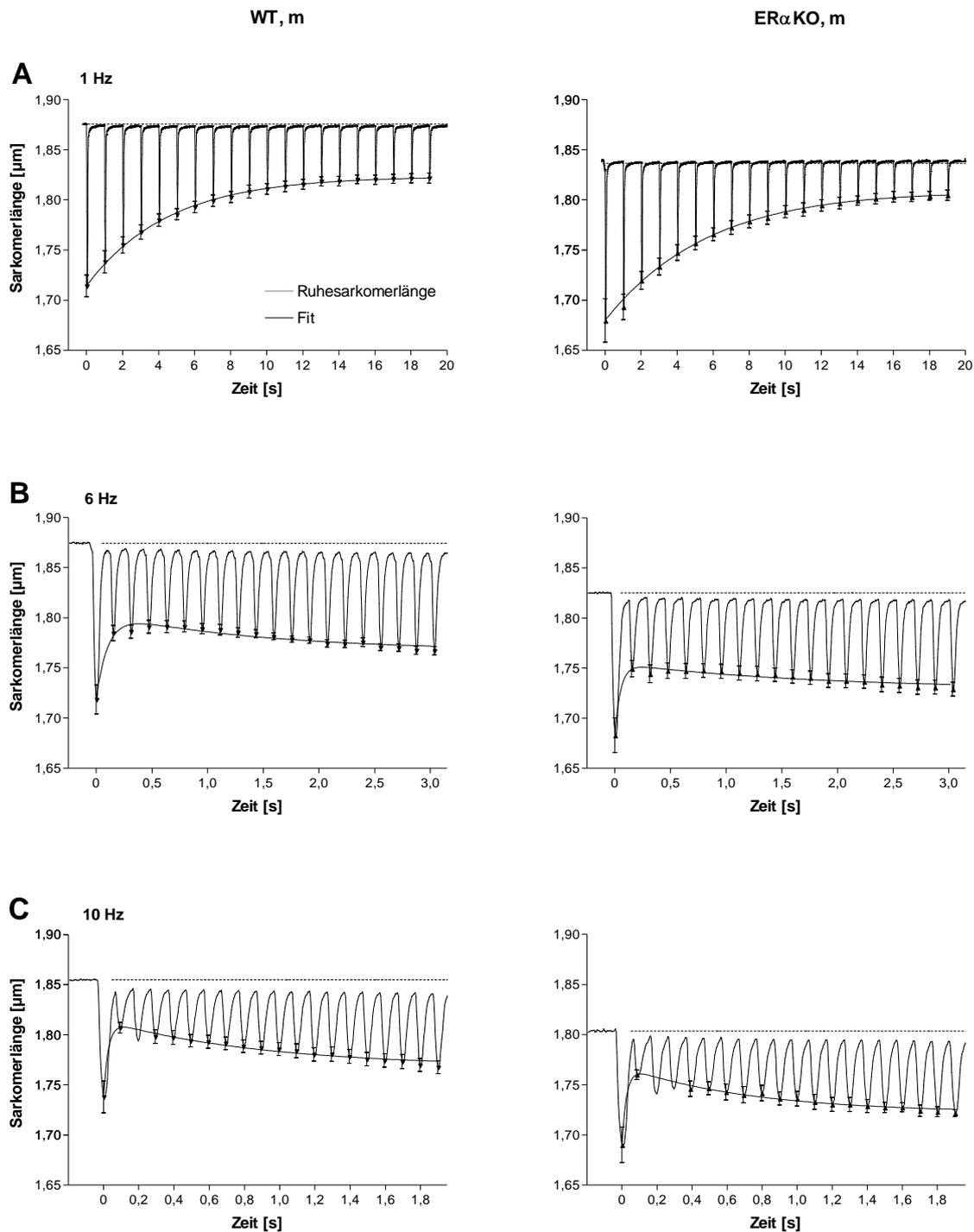


Abbildung 3.27: Sarkomerverkürzung männlicher ERαKO und WT Zellen nach Stimulationspause
 Gemittelte Sarkomerverkürzungen nach 30 Sekunden Stimulationspause bei 1 (A), 6 (B) und 10 Hz (C) Stimulationsfrequenz. Links sind Verkürzungen männlicher (m) WT und rechts männlicher ERαKO Zellen dargestellt. Jeder Graph zeigt 20 Verkürzungen, daher sind die Zeitachsen unterschiedlich. An die mittleren Verkürzungsspitzenwerte \pm SEM wurde die Funktion 2.1 angepasst. A: WT, $n=10$, ERαKO, $n=10$; B: WT, $n=9$, ERαKO, $n=10$; C: WT, $n=10$, ERαKO, $n=10$.

Die ersten (τ_1) und zweiten (τ_2) Zeitkonstanten reduzierten sich mit zunehmender Stimulationsfrequenz in beiden Geschlechtern (Abbildung 3.28 und Abbildung 3.29) z.B. τ_1 verkürzte sich in weiblichen WT Zellen von 9,9 s bei 0,5 Hz auf 0,5 s bei 4 Hz und τ_2 von 1,5 s bei 6 Hz auf 0,8 s bei 10 Hz. In weiblichen Kardiomyozyten führte die ER α -Defizienz zu einer signifikanten Verkürzung ($p < 0,01$) der ersten Zeitkonstante bei 6 Hz Stimulationsfrequenz (WT: $1,5 \pm 0,17$ s; ER α KO: $0,07 \pm 0,01$ s; MW \pm SD). Bei dieser Frequenz entwickelten die ER α KO Zellen keine positive Herzterppe und daher ergab sich auch keine zweite Zeitkonstante. Bei 8 und 10 Hz unterschieden sich die zweiten Zeitkonstanten nicht signifikant. In männlichen Mäusen beeinflusste die ER α -Defizienz die erste Zeitkonstante konträr: Bei 1, 2, 4 und 8 Hz lagen verlängerte Untersuchungswerte vor, bei 0,5, 6 und 10 Hz verkürzte. Die Unterschiede waren signifikant ($p < 0,01$) bei 0,5, 1 und 4 Hz. Für die zweite Zeitkonstante war ein ähnliches Verhalten zu beobachten: In ER α KO war diese signifikant ($p < 0,05$) verlängert bei 6 Hz, aber signifikant ($p < 0,01$) verkürzt bei 8 und 10 Hz Stimulationsfrequenz.

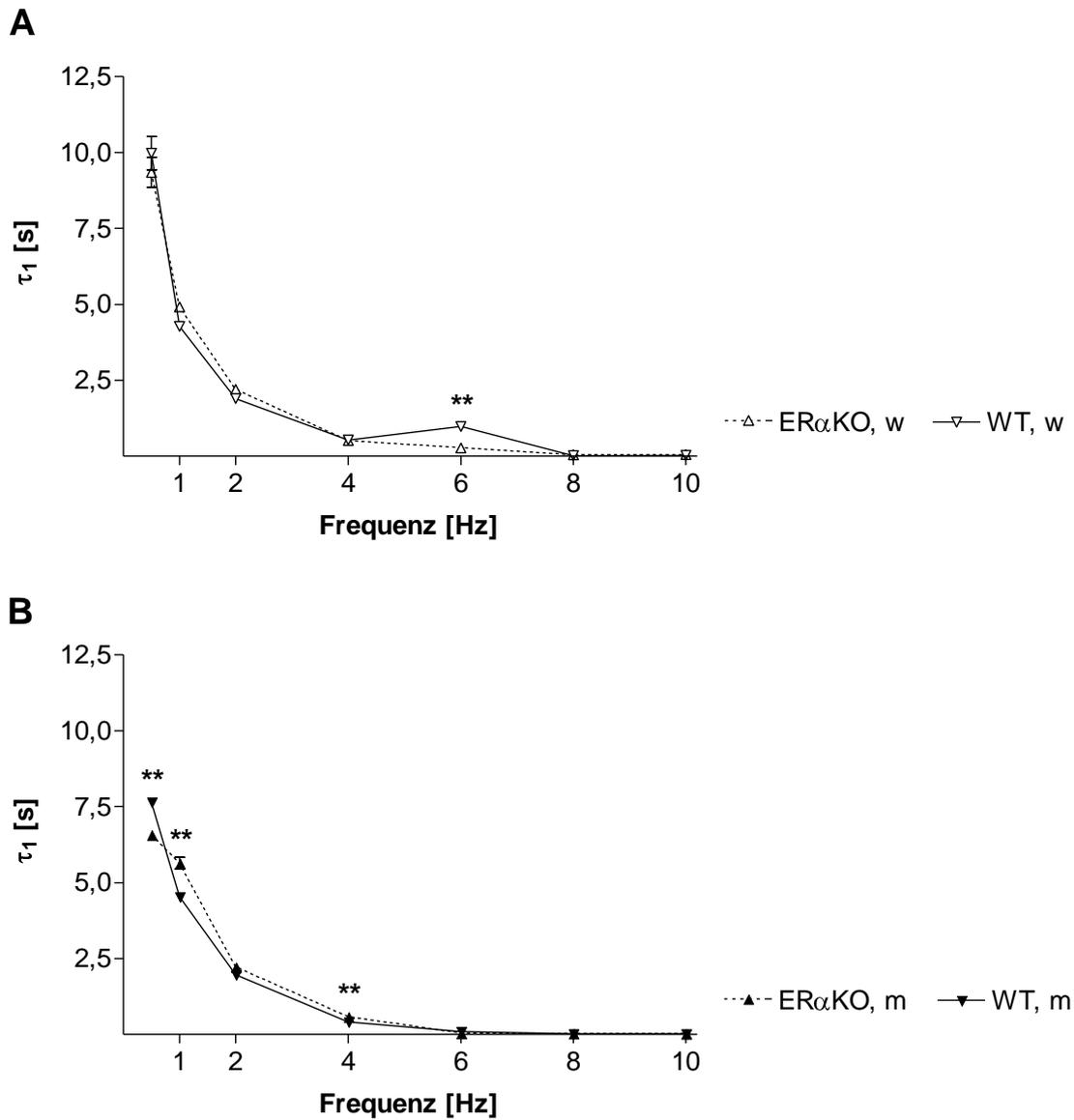


Abbildung 3.28: Zeitverläufe der Herztreppe weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Die ersten (τ_1) Zeitkonstanten der weiblichen (A) und männlichen (B) ER α KO und WT Kardiomyozyten verkürzten sich mit zunehmender Frequenz. Die ER α -Defizienz beeinflusste die erste Zeitkonstante in weiblichen Zellen nur bei 6 Hz, in männlichen Zellen bei 0,5, 1 und 4 Hz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4-10 Zellen, ** $p < 0,01$.

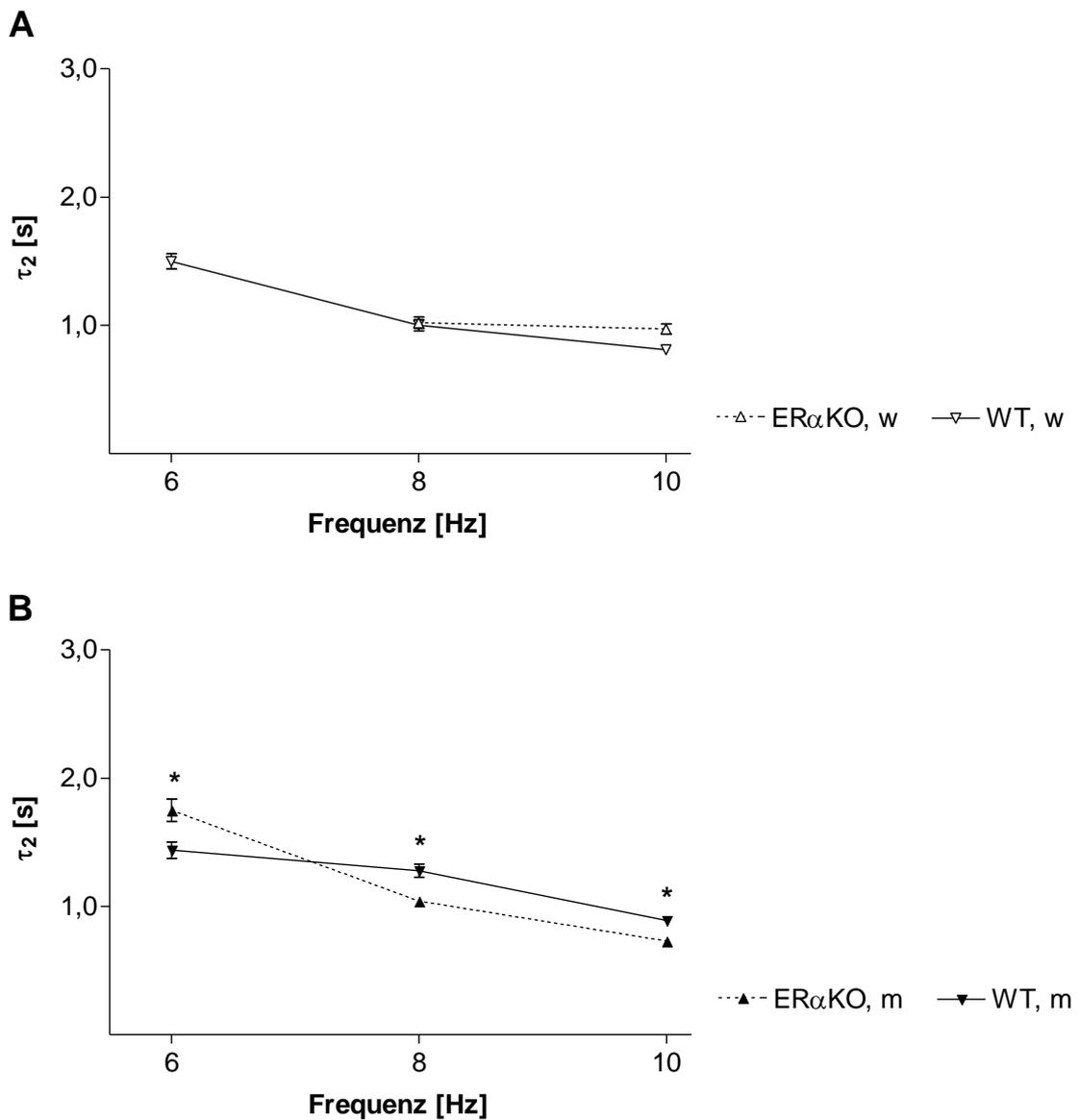


Abbildung 3.29: Zeitverläufe der Herztreppen weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Die zweiten (τ_2) Zeitkonstanten der weiblichen (A) Zellen unterschieden sich bei 8 und 10 Hz nicht. Bei 6 Hz bildeten jedoch nur weibliche WT Zellen eine positive Herzterappe. Die ER α -Defizienz beeinflusst die zweite Zeitkonstante der männlichen ER α KO und WT Kardiomyozyten (B) signifikant. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4-10 Zellen, * $p < 0,05$.

3.1.4.3 „Post Rest“ Verkürzung

Die Auswertung der „Post Rest“ Verkürzung liefert eine Aussage über die Fähigkeit des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) Ca^{2+} zu speichern; denn die „Post Rest“ Verkürzung hängt in einem höheren Maße von der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR ab als eine Verkürzung im „Steady State“. Die Messung der „Post Rest“ Verkürzung erfolgte nach 30 s Pause in Anschluss an die 1 Hz Stimulation. In der Auswertung berücksichtigt wurden nur Zellen, die während der Pausenzeit keine Spontanaktivität zeigten.

Die ER α -Defizienz reduzierte die Sarkomerverkürzungsamplitude in beiden Geschlechtern, wobei das Niveau einer Signifikanz nur bei der männlichen Gruppe erreicht wurde (Abbildung 3.30).

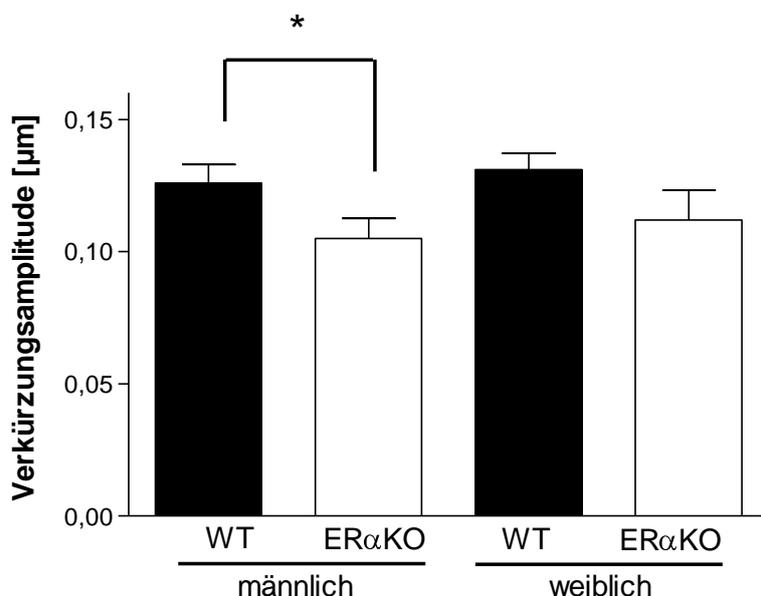


Abbildung 3.30: „Post Rest“ Sarkomerverkürzungsamplitude weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten
 Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 13-30 Zellen. Die ER α -Defizienz reduzierte die Sarkomerverkürzungsamplitude männlicher Kardiomyozyten um 17%, * $p < 0,05$.

Ebenso verminderte die ER α -Defizienz die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit der „Post Rest“ Verkürzung signifikant in männlichen Kardiomyozyten. In der weiblichen Untersuchungsgruppe ergab sich bezüglich der Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit kein Einfluss der ER α -Defizienz (Abbildung 3.31).

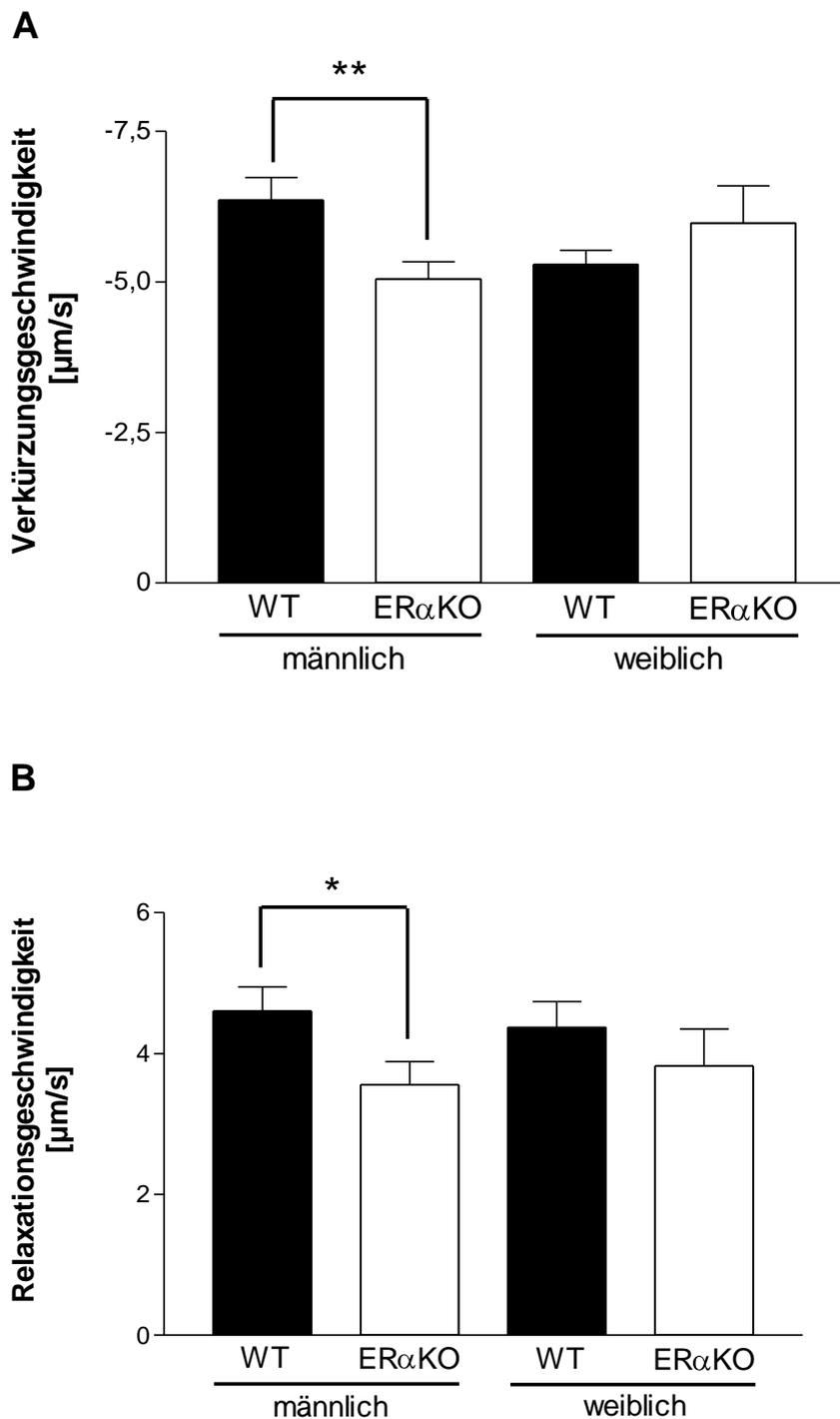


Abbildung 3.31: Sarkomerverkürzungsgeschwindigkeiten der „Post Rest“ Verkürzung weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten
 Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 13-30 Zellen. Männliche ER α defiziente Zellen kontrahierten und relaxierten langsamer als WT Kardiomyozyten, * p <0,05, ** p <0,01.

Die Dauer der „Post Rest“ Verkürzung lag zwischen 0,1 und 0,106 s. Diese wurde durch die ER α -Defizienz in keinem der Geschlechter signifikant verändert.

3.2 Einfluss des Östrogenrezeptors α auf den L-Typ Ca^{2+} -Strom

Zur genaueren Erklärung der in den Verkürzungsmessungen gezeigten Einflüsse der ER α -Defizienz wurden L-Typ Ca^{2+} -Strommessungen an Kardiomyozyten beiderlei Geschlechts und jeweils von beiden Genotypen vorgenommen. Es wurden rechteckförmige Spannungsklemmen verwendet. Abbildung 3.32 zeigt exemplarisch Membranstromregistrierungen einer weiblichen WT Kardiomyozyte ausgelöst durch ein Doppelpulsprotokoll mit repolarisierenden Zwischenpuls (Kapitel 2.4.2.2). Die Vorklemme auf -35 mV löste den schnellen Na^{2+} Strom mit anschließender Inaktivierung aus. Die Depolarisation während T1 führte zur Aktivierung des $I_{\text{Ca,L}}$. Nach Erreichen des Spitzenstromwertes inaktiviert der Strom mit einem exponentiellen Zeitverlauf. Maximale Werte der Spitzenstromamplituden wurden in den untersuchten murinen Kardiomyozyten durch Spannungssprünge auf 0 mV erreicht. T2 löste anschließend diejenigen Anteile des $I_{\text{Ca,L}}$ aus, die während T1 nicht inaktiviert wurden.

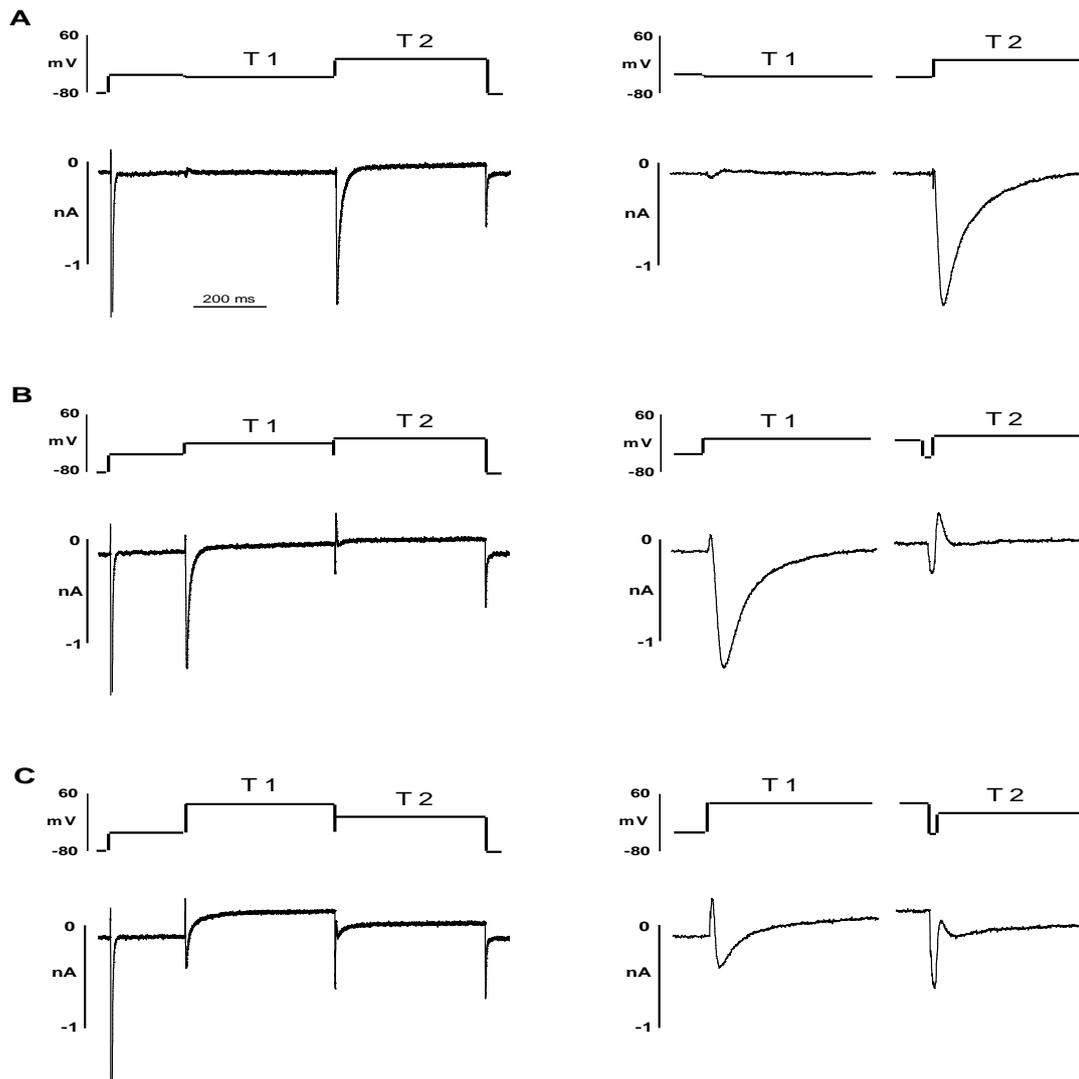


Abbildung 3.32: Originalregistrierung des L-Typ Ca^{2+} -Strom während rechteckförmiger Spannungsklemmen.

Dargestellt sind original Membranströme mit den dazugehörigen Spannungsklemmen. Das Pulsprotokoll bestand aus einer Vorklemme (-35 mV , 200 ms) einer ersten Testklemme (T1) zur Bestimmung der Strom/Spannungsbeziehung und der „Steady State“ Aktivierung (T1 zwischen -40 und 60 mV in 5 mV Abstufungen, 400 ms) und einer zweiten Testklemme (T2) zur Bestimmung der „Steady State“ Inaktivierung (10 mV , 400 ms). Ein repolarisierender Zwischenpuls (-40 mV , 2 ms) trennte T1 und T2. In A sind die Membranströme bei -40 mV , in B bei 0 mV und in C bei 40 mV gezeigt. Im linken Teil der Abbildung ist der gesamte Zeitverlauf dargestellt, im rechten Teil jeweils nur die ersten 50 ms von T1 und T2. Die Vorklemme löst den schnellen Na^+ -Strom aus. T1 führt zur schnellen Aktivierung des $\text{I}_{\text{Ca,L}}$. Mit zunehmender Depolarisation steigt die Spitzenstromamplitude bis zu einem Maximum bei 0 mV . Nach Erreichen eines Spitzenwertes inaktiviert der $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ mit einem exponentiellen Zeitverlauf. T2 löste die während T1 nicht aktivierten Stromanteile des $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ aus. Die exemplarisch gezeigten Stromregistrierungen stammen von einer weiblichen Kontrollzelle mit einer Membrankapazität von 110 pF und sind charakteristisch für die vorliegende Untersuchung.

3.2.1 Strom-Spannungsbeziehung

Abbildung 3.33 zeigt Originalregistrierungen des $I_{Ca,L}$ von weiblichen (A) und männlichen (B) Zellen ausgelöst durch eine Spannungsklemme auf 0 mV. Deutlich zu erkennen ist der starke Anstieg der Spitzenstromamplitude in männlichen ER α KO Zellen.

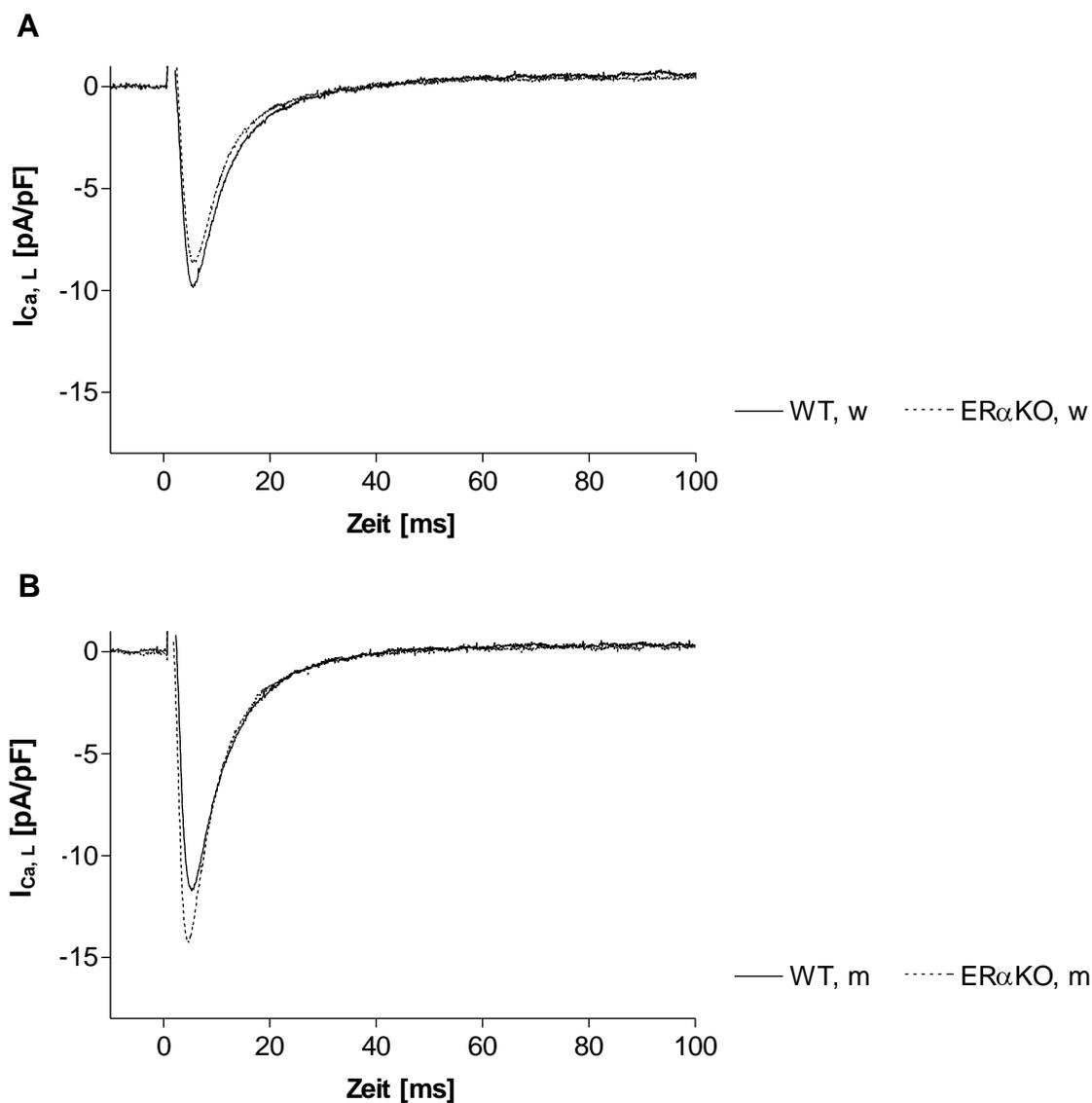


Abbildung 3.33: Originalregistrierung des $I_{Ca,L}$ weiblicher und männlicher ER α KO und WT Zellen

Der $I_{Ca,L}$ wurde in weiblichen (A) und männlichen (B) ER α KO und WT Kardiomyozyten durch eine rechteckförmige Spannungsklemme von -35 mV auf 0 mV ausgelöst. Zur Vergleichbarkeit wurden die Stromamplituden auf die jeweilige Membrankapazität normiert und um den spezifischen Leck-Strom nach oben verschoben.

Die Amplituden des Spitzenstromwertes der untersuchten Kardiomyozyten waren potentialabhängig (Abbildung 3.34). Ausgehend von -35 mV Klemmspannung stieg der $I_{Ca,L}$ kontinuierlich an. Bei 0 mV erreichten die Spitzenströme maximale Werte. Weitere

Depolarisation verringerte die Spitzenstromamplituden des einwärtsgerichteten $I_{\text{Ca,L}}$. Das Umkehrpotential lag zwischen 63,9 und 64,7 mV. Für alle Gruppen ergab sich der für den Ca^{2+} -Strom typische U-förmige Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie (IV-Kennlinie).

Die $\text{ER}\alpha$ -Defizienz in männlichen und weiblichen Zellen beeinflusste weder die Form noch die Lage der IV-Kennlinie (Abbildung 3.34). Die Spitzenstromamplitude stieg in männlichen $\text{ER}\alpha\text{KO}$ Kardiomyozyten um ca. 29% auf -12,26 pA/pF an. In weiblichen Tieren hingegen führte die $\text{ER}\alpha$ -Defizienz zu keiner Veränderung der Spitzenstromamplituden.

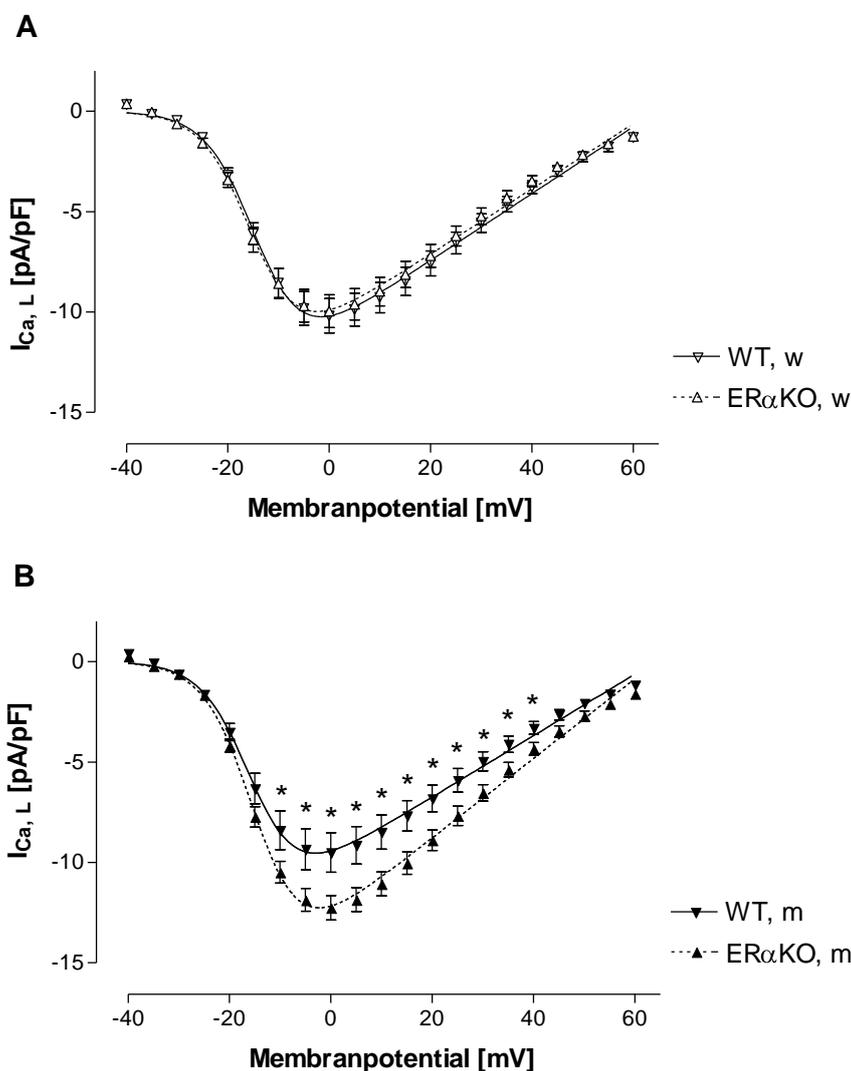


Abbildung 3.34: Strom-Spannungs-Kennlinie des L-Typ Ca^{2+} -Stromes

Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM (12-21 Zellen) von isolierten weiblichen (A) und männlichen (B) $\text{ER}\alpha\text{KO}$ und WT Kardiomyozyten. Die Strom-Spannungskurve zeigt einen U-förmigen Verlauf. Das Schwellenpotential liegt bei -35 mV. Die Maximalamplitude wird bei 0 mV erreicht. In männlichen Kardiomyozyten vergrößert die Östrogenrezeptor α -Defizienz den L-Typ Ca^{2+} -Strom, * $p < 0,05$.

3.2.2 Aktivierungskinetik

Die Aktivierungskurve beschreibt die Spannungsabhängigkeit der „Steady State“ Aktivierung (d_{∞}). Das Maximum der „Steady State“ Aktivierung wurde bei ca. 15 mV erreicht. Die Potentialwerte für die halbmaximale Aktivierung ($V_{1/2}$) lagen zwischen -13,3 und -15,2 mV (Steigungsfaktor zwischen 5,0 und 5,9; Tabelle 3.1). In beiden Geschlechtern wurden die Aktivierungsparameter nicht signifikant durch die ER α -Defizienz beeinflusst.

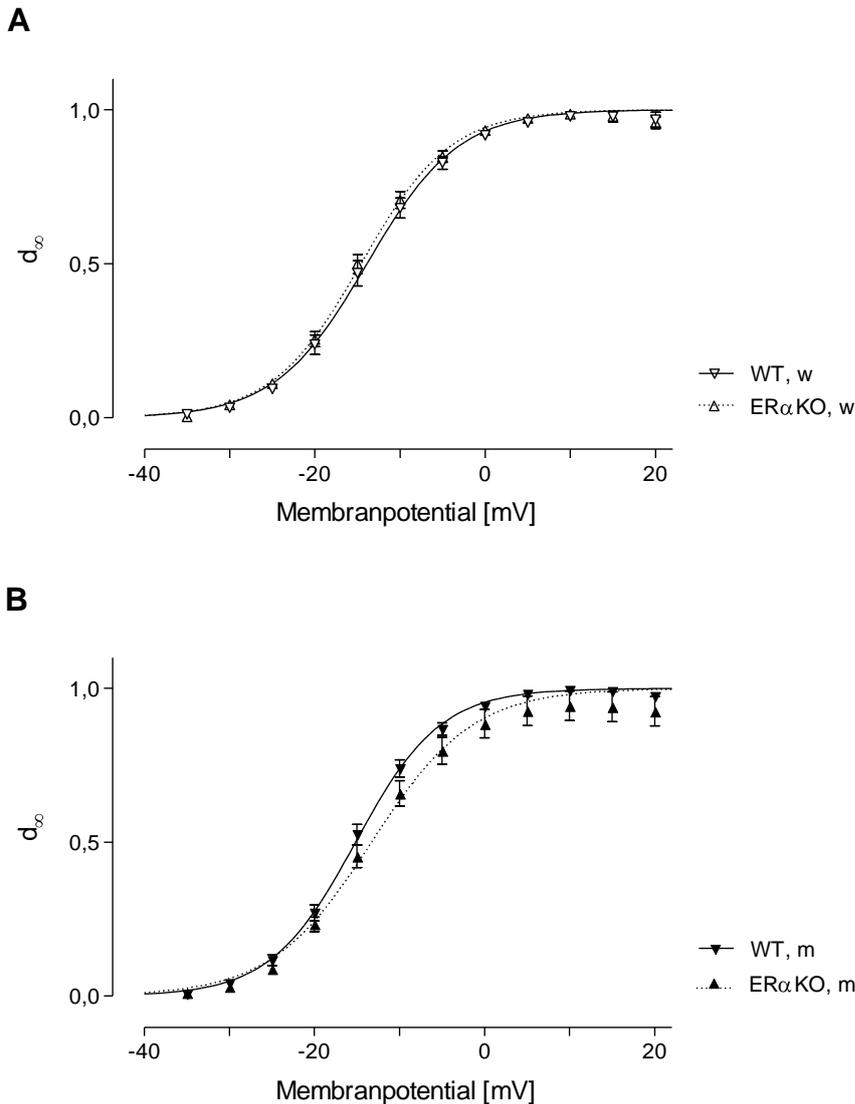


Abbildung 3.35: Aktivierungskurve des $I_{Ca,L}$ weiblicher und männlicher ER α KO- und Kontrollzellen
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 12-21 Zellen. Die Aktivierungsparameter d_{∞} wurden gegen die entsprechenden Testpotentiale aufgetragen. Bei ca. 15 mV wurde der $I_{Ca,L}$ maximal aktiviert. Daher erfolgt die Darstellung nur bis 20 mV. Die ER α -Defizienz übte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierungsparameter aus.

3.2.3 Inaktivierungskinetik

Die mittels einer Doppelpulsklemme mit repolarisierendem Zwischenpuls (Kapitel 2.4.2.2) ermittelte „Steady State“ Inaktivierungskurve ist U-förmig (Abbildung 3.36). Ab Testpotentialen von -35 mV (T1) nahm die Inaktivierung des $I_{\text{Ca,L}}$ zu. Die Inaktivierung war maximal (d.h. f_{∞} minimal) bei 10-15 mV. Mit zunehmender Depolarisation reduzierte sich die Inaktivierung. Die ER α -Defizienz beeinflusste die Potentiale der halbmaximalen Inaktivierung in weiblichen und männlichen Zellen unterschiedlich. In Weibchen reduzierte sich das Potential signifikant ($p < 0,01$) um 1,2 mV während es sich in Männchen signifikant ($p < 0,01$) um 3,6 mV erhöhte (Tabelle 3.1).

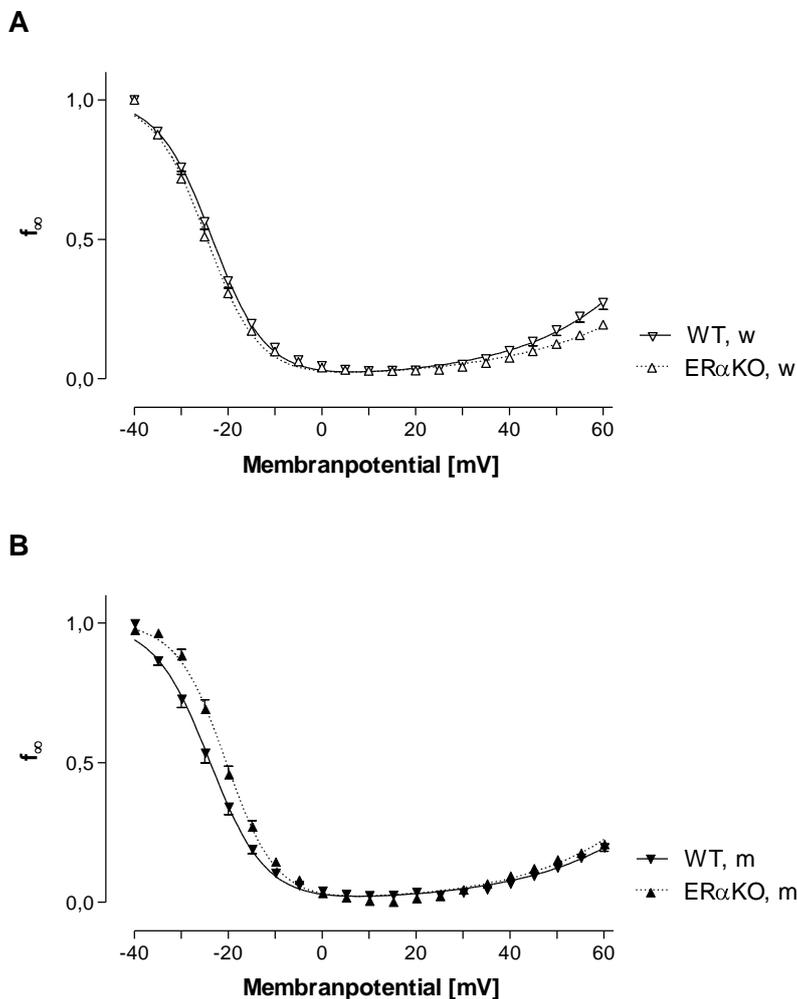


Abbildung 3.36: Inaktivierungskurve des $I_{\text{Ca,L}}$ weiblicher und männlicher ER α KO und Kontrollzellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 12-21 Zellen. Die Inaktivierungsparameter (f_{∞}) wurden gegen die entsprechenden Testpotentiale aufgetragen. An die Messwerte wurde die in Gleichung 2.6 beschriebene Summe zweier Boltzmannfunktionen angepasst. Die ER α -Defizienz reduzierte in weiblichen Tieren das Potential der halbmaximalen Inaktivierung, in männlichen Tieren hingegen erhöhte sie dieses.

Tabelle 3.1 fasst die Charakteristika der untersuchten L-Typ Ca^{2+} -Ströme von weiblichen und männlichen ER α KO und WT Kardiomyozyten zusammen.

Tabelle 3.1: Charakterisierung des L-Typ Ca^{2+} -Stromes weiblicher und männlicher ER α KO und WT Zellen. Mittelwert \pm SD. * $p < 0,05$ im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren.

G_{Max} = maximale Leitfähigkeit; V_{rev} = Umkehrpotential; $V_{1/2}(d_{\infty})$ = Potential halbmaximaler Aktivierung; $V_{1/2}(f_{\infty})$ = Potential halbmaximaler Inaktivierung; k = Steigung der Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskurve

	WT		ER α KO	
	♀	♂	♀	♂
n	12	11	13	21
Spitzenstrom, pA/pF	$-10,2 \pm 3,0$	$-9,5 \pm 3,4$	$-10,0 \pm 3,0$	$-12,3 \pm 2,8^*$
G_{max} , pS/pF	$157,5 \pm 49,8$	$155,4 \pm 58,5$	$155,9 \pm 48,1$	$181,3 \pm 59,7$
V_{rev} , mV	$64,7 \pm 0,9$	$64,1 \pm 1,0$	$63,9 \pm 1,0$	$64,4 \pm 1,0$
$V_{1/2}(d_{\infty})$, mV	$-13,9 \pm 5,2$	$-15,2 \pm 2,8$	$-14,6 \pm 3,3$	$-13,3 \pm 6,8$
$V_{1/2}(f_{\infty})$, mV	$-23,4 \pm 0,2$	$-23,9 \pm 0,3$	$-24,6 \pm 0,3^*$	$-20,3 \pm 1,2^*$
$k(d_{\infty})$	$5,4 \pm 4,6$	$5,0 \pm 2,4$	$5,2 \pm 4,6$	$5,9 \pm 6$
$k(f_{\infty})$	$5,7 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,2^*$
Zellkapazität	$134,3 \pm 18,2$	$164,7 \pm 27,3$	$143,2 \pm 35,4$	$132,9 \pm 27,3^*$

3.3 Einfluss des Östrogenrezeptors α auf das Aktionspotential

Die Aktionspotentialmessungen erfolgten im Ganzellmodus der Patch-clamp-Technik unter physiologischen Bedingungen. Das Ruhemembranpotential der untersuchten Zellen lag zu Beginn der Messung durchschnittlich zwischen -71 und -75 mV (Tabelle 7.11). Diese Werte unterschieden sich weder zwischen den Genotypen noch zwischen den Geschlechtern. Ein kurzer depolarisierender Reizstrom löste das Aktionspotential (AP) aus. In kürzester Zeit depolarisierten die Zellen im Mittel auf Werte zwischen 44 und 64 mV (Tabelle 7.12).

Darauf folgte die für murine Ventrikelmyozyten typische direkte Repolarisation ohne lange Plateauphase. Abbildung 3.37 zeigt charakteristische weibliche ER α KO und WT APs. Die gemessenen weiblichen und auch männlichen Zellen variierten stark in ihrer Repolarisationsdauer.

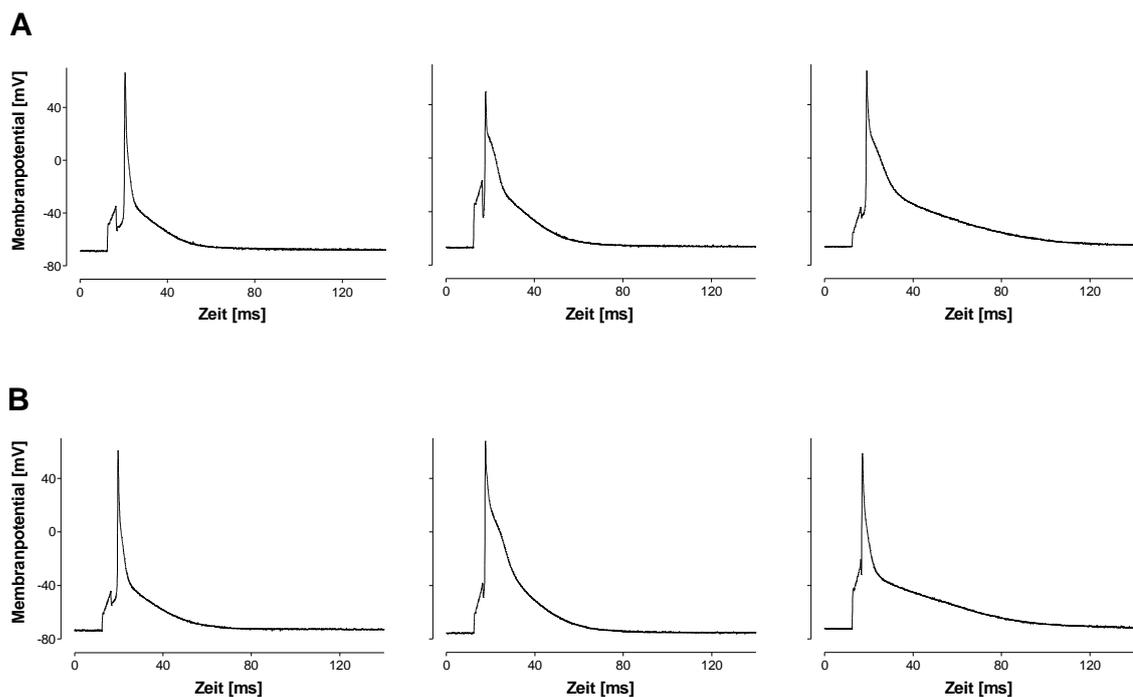


Abbildung 3.37: Aktionspotentialformen weiblicher WT und ER α KO Zellen

Aktionspotentialmessungen erfolgten im Ganzellmodus der Patch-Clamp-Technik bei 36° C. Ein rechteckförmiger Strompuls löste die APs aus. Dargestellt sind weibliche WT (A) und ER α KO (B) APs verschiedener Zellen bei $0,5$ Hz Stimulationsfrequenz. In den untersuchten Zellen variierte die gemessene Repolarisationsdauer stark.

Abbildung 3.38 vergleicht die Dauer des Aktionspotentials bis zur 50%igen Repolarisation (APD₅₀). In weiblichen Ventrikelmyozyten führte die ER α -Defizienz zu einer gerin-

gen Verkürzung der APD_{50} in allen Frequenzbereichen außer bei 8 Hz Stimulationsfrequenz. In männlichen Zellen bewirkte die $ER\alpha$ -Defizienz eine Verlängerung der APD_{50} in den meisten Frequenzen, außer bei 2 und 10 Hz. Die beobachteten Veränderungen durch die $ER\alpha$ -Defizienz waren in beiden Geschlechtern im Mittelwertvergleich nicht signifikant. Der Mittelwertvergleich der weiblichen und männlichen WT Werte ergab jedoch eine signifikant verkürzte APD_{50} bei 4 und 8 Hz Stimulationsfrequenz in männlichen WT Mäusen. Das Fehlen des $ER\alpha$ hob diesen signifikanten Unterschied auf.

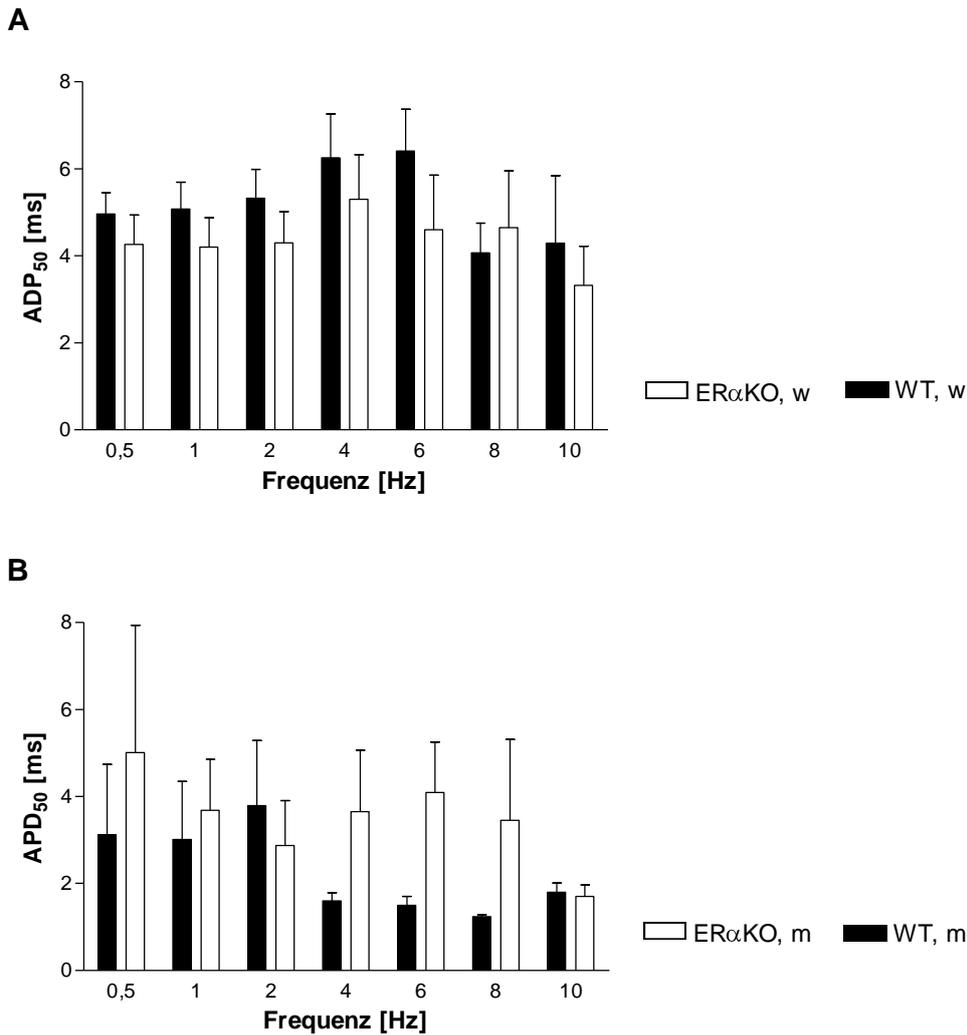


Abbildung 3.38: APD_{50} von weiblichen und männlichen $ER\alpha$ KO und WT Kardiomyozyten
 APD_{50} von weiblichen (A) und männlichen (B) $ER\alpha$ KO und WT Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Frequenz, Mittelwert \pm SEM von 2-16 Zellen. In die Auswertung einbezogen wurden nur Zellen, die mindestens bis 4 Hz Stimulationsfrequenz messbar waren. Weibliche $ER\alpha$ KO Kardiomyozyten zeigten in nahezu allen Frequenzbereichen eine verkürzte APD_{50} . In männlichen Zellen verlängerte die $ER\alpha$ -Defizienz die APD_{50} außer bei 2 und 10 Hz Stimulationsfrequenz. In beiden Geschlechtern konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Die Dauer des APs bis zur 90%igen Repolarisation (APD_{90}) war in beiden Geschlechtern in fast allen Frequenzbereichen durch die $ER\alpha$ -Defizienz verkürzt (Abbildung 3.39). Eine signifikante verminderte Repolarisationsdauer konnte jedoch nur für männliche Kardiomyozyten bei 2 Hz Stimulationsfrequenz (WT: $41,2 \pm 10,9$ ms, $n = 7$ vs. $ER\alpha KO$: $27,9 \pm 7,8$ ms, $n = 9$) nachgewiesen werden.

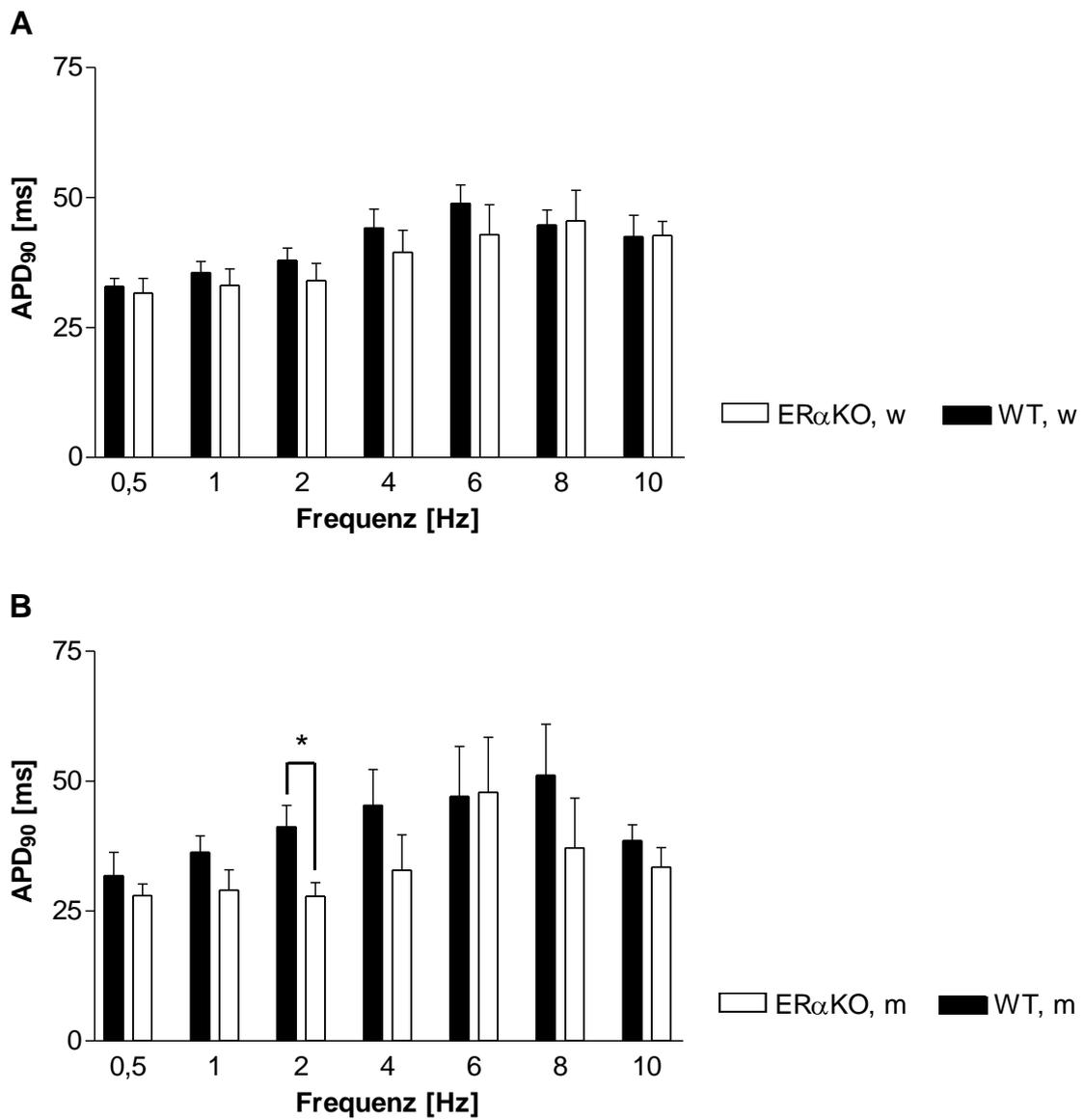


Abbildung 3.39: APD_{90} von weiblichen und männlichen $ER\alpha KO$ und WT Kardiomyozyten
 APD_{90} von weiblichen (A) und männlichen (B) $ER\alpha KO$ und WT Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Frequenz, Mittelwert \pm SEM von 2-16 Zellen. In die Auswertung einbezogen wurden nur Zellen, die mindestens bis 4 Hz Stimulationsfrequenz messbar waren. $ER\alpha KO$ Kardiomyozyten beider Geschlechter zeigten in nahezu allen Frequenzbereichen eine verkürzte APD_{90} . Ein signifikanter Unterschied liegt jedoch nur in männlichen Zellen bei 2 Hz Stimulationsfrequenz vor, $*p < 0,05$.

Die Untersuchung der Aktionspotentiale unterschiedlicher Frequenzen deckte ein frequenzabhängiges Verhalten der APD_{90} auf. In Abbildung 3.40 sind Aktionspotentiale einer weiblichen Ventrikelmyozyte gemessen bei 1, 4 und 10 Hz Stimulationsfrequenz dargestellt. Mit steigender Frequenz verlängerte sich in dieser Zelle die dritte Phase der Repolarisation. Die anderen Phasen des APs waren nicht wesentlich verändert.

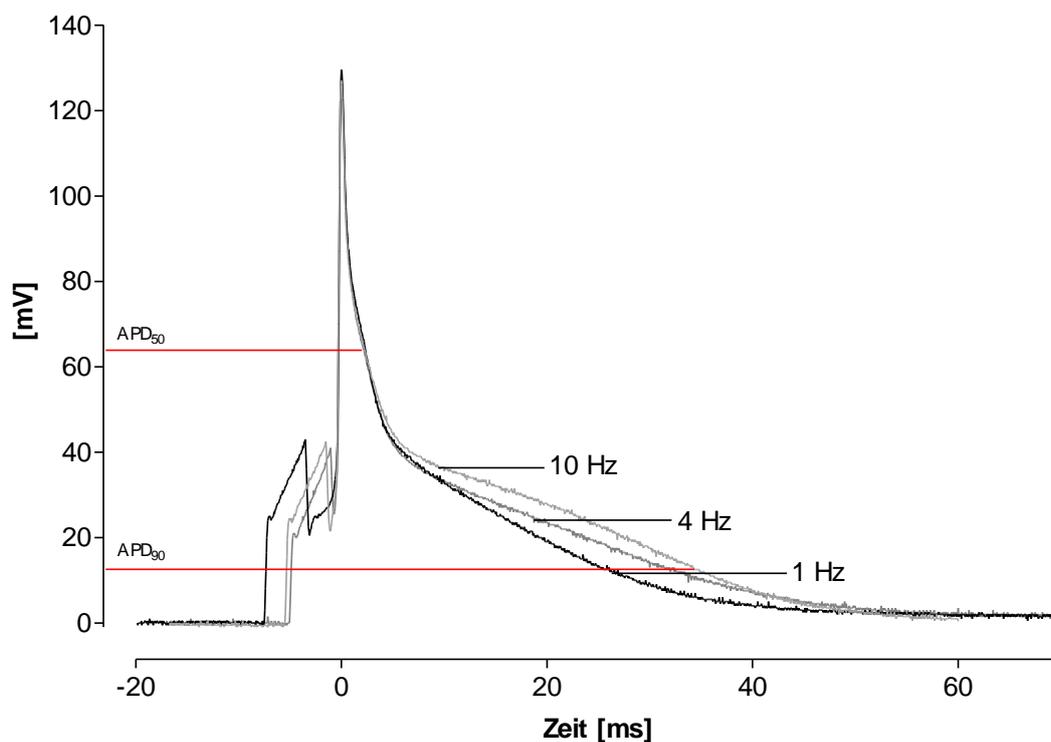


Abbildung 3.40: Frequenzabhängige Repolarisationsdauer des Aktionspotentials eines murinen Kardiomyozytes

Exemplarisch dargestellt sind die Aktionspotentiale einer weiblichen WT Kardiomyozyte bei 1, 4 und 10 Hz Stimulationsfrequenz. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ruhepotentiale auf 0 mV und der Spitzenwert auf 0 ms normiert. Mit zunehmender Frequenz verlängerte sich die APD_{90} (1 Hz: 25,3 ms; 4 Hz: 31,23 ms; 10 Hz: 35,76 ms).

Die frequenzabhängige Untersuchung der APD_{90} weiblicher WT Zellen (Abbildung 3.41) ergab eine signifikante Zunahme der APD_{90} bei 8 ($36,8 \pm 6,2$ ms, $n=4$) und 10 Hz ($42,5 \pm 10,1$ ms, $n=6$) Stimulationsfrequenz im Vergleich zur APD_{90} bei 0,5 Hz Stimulationsfrequenz. Das Ruhemembranpotential, das Potential des Spitzenwertes und die APD_{50} (Tabelle 7.13) zeigten keine frequenzabhängigen Veränderungen.

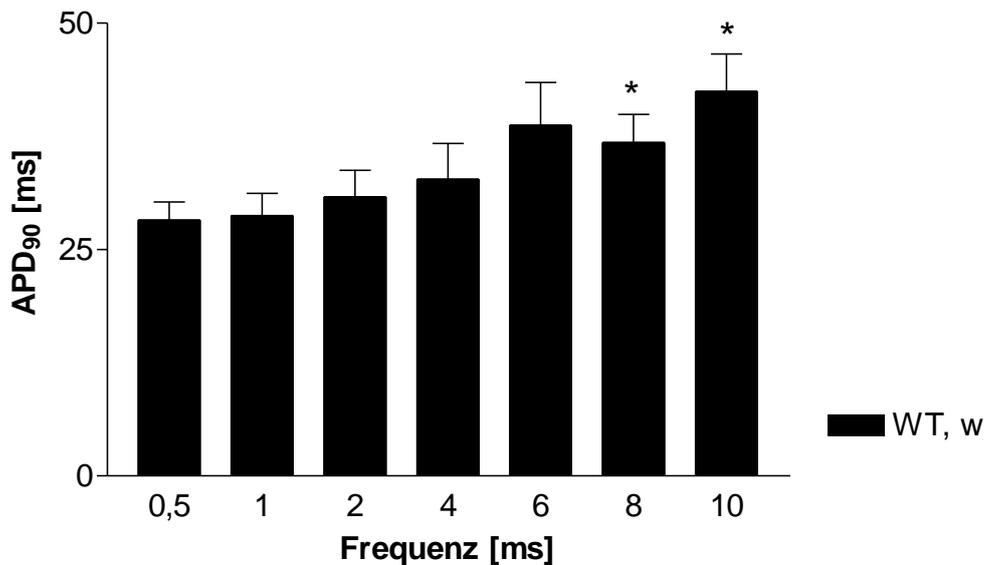


Abbildung 3.41: Frequenzabhängige Zunahme der APD_{90} in murinen Kardiomyozyten

Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM der APD_{90} von weiblichen WT Kardiomyozyten. Einbezogen wurden nur Zellen, die auch bei 10 Hz Stimulationsfrequenz messbar waren ($n = 4-6$ Zellen). * $p < 0,05$ im Vergleich zum MW bei 0,5 Hz.

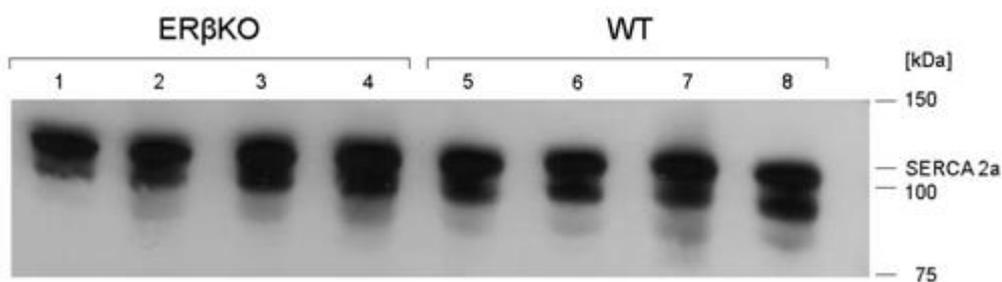
Zur Untersuchung des frequenzabhängigen Verhaltens der APD_{90} wurden nur Zellen verwendet, die auch bei 10 Hz Stimulationsfrequenz messbar waren. Aufgrund dieses Kriteriums waren zu wenige Messdaten von männlichen WT Zellen vorhanden, um diesen Parameter auch für diese Untersuchungsgruppe zu analysieren.

3.4 Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die Expression linksventrikulärer Proteine

3.4.1 Expression der calciumregulatorischen Proteine sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2a und Phospholamban in männlichen ER β -defizienten und WT Mäusen

Weder die Expression der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA 2a, Abbildung 3.42) noch die des Phospholambans (PLB, Abbildung 3.43) wurden in männlichen Tieren durch die ER β -Defizienz beeinflusst.

A



B

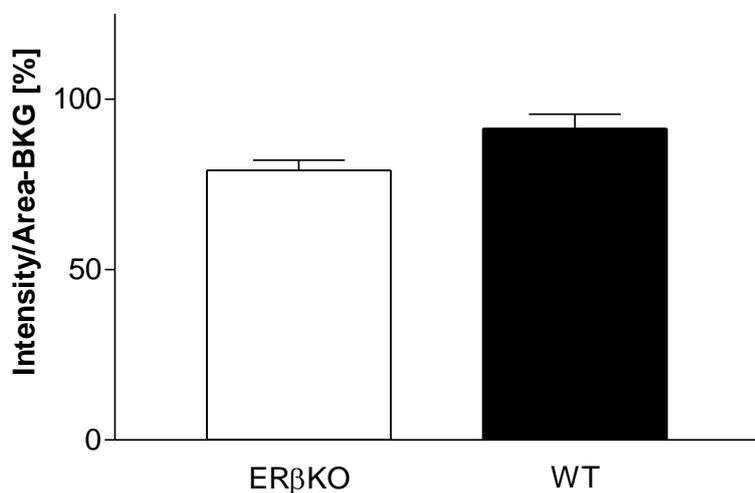


Abbildung 3.42: SERCA 2a Expression in Herzen von männlichen WT und ER β -defizienten Mäusen
A zeigt den SERCA 2a-Westernblot. Es wurden Proteinlysate aus vier Tieren analysiert. Die Bande bei 115 kDa entspricht SERCA 2a. In B sind die Mittelwerte \pm SEM der densitometrischen Auswertung dargestellt.

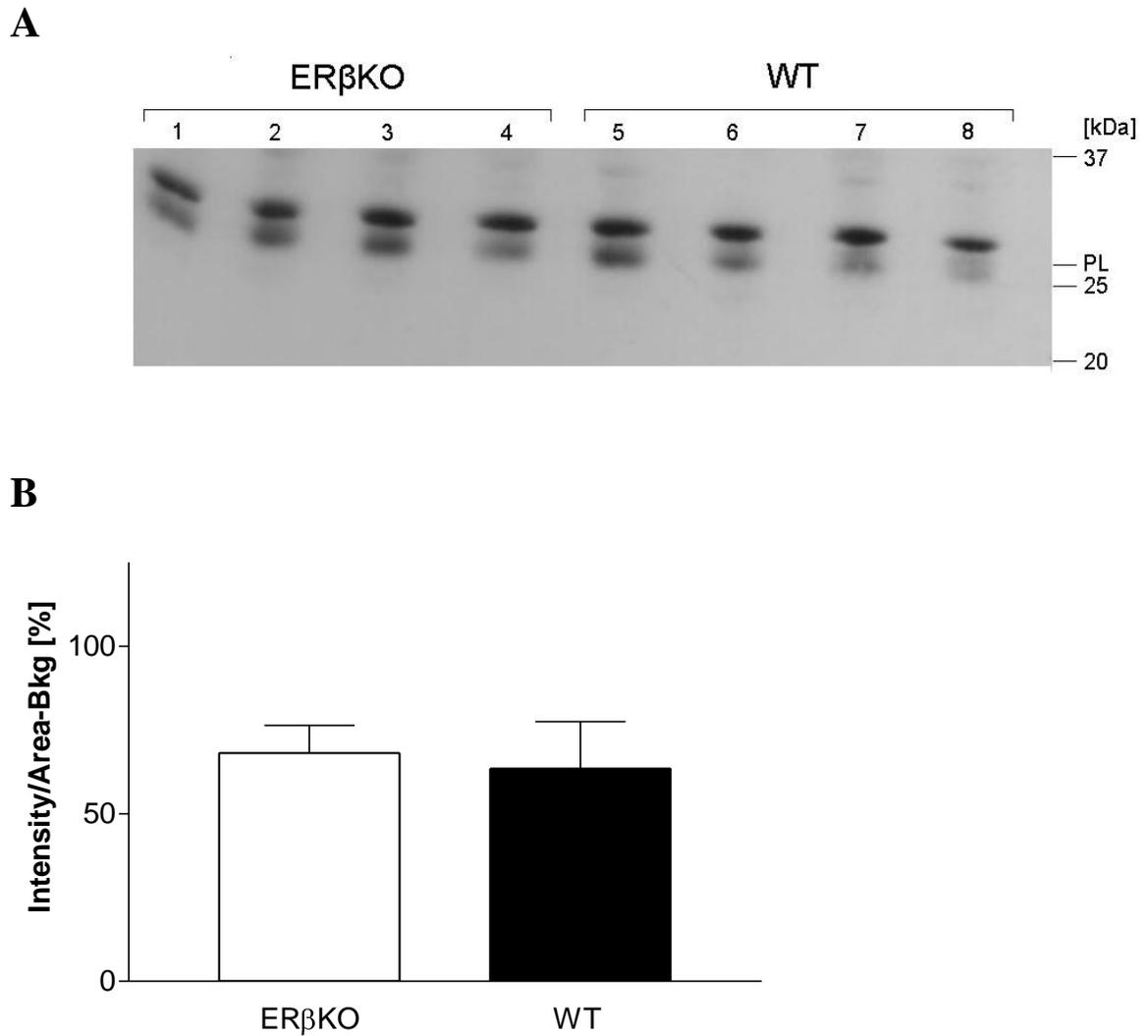
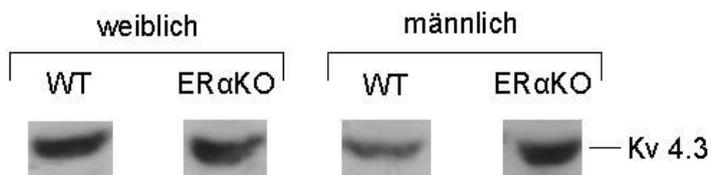


Abbildung 3.43: PLB Expression in Herzen von männlichen WT und ER β -defizienten Mäusen
A zeigt den PLB-Westernblot. Es wurden Proteinlysate aus vier Tieren analysiert. Die Bande bei 28 kDa entspricht PLB. In B sind die Mittelwerte \pm SEM der densitometrischen Auswertung dargestellt.

3.4.2 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die K^+ -Kanal 4.3 (Kv 4.3) Expression

Die Expression des Kv 4.3 wurde in weiblichen Tieren kaum durch die ER α -Defizienz beeinflusst (Abbildung 3.44). In männlichen Tieren hingegen führte das Fehlen des ER α zu einer Hochregulation der Kv 4.3 Kanalexpression um das 1,4-fache (Abbildung 3.44).

A



B

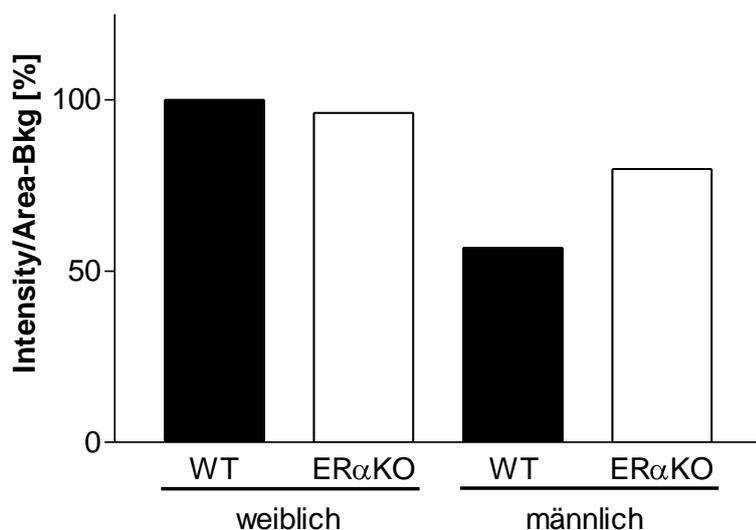


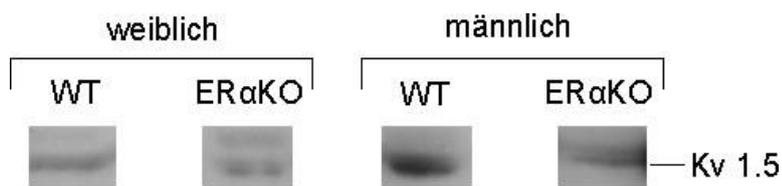
Abbildung 3.44: Kv4.3 Expression in der cytoplasmatischen Fraktion von weiblichen und männlichen ER α KO und WT Kardiomyozyten

A zeigt den Kv 4.3-Westernblot. Die Bande bei 65 kDa entspricht Kv 4.3. In den Ansätzen wurden jeweils Zellen aus vier Tieren zusammengefasst. In B ist die densitometrische Auswertung dargestellt.

3.4.3 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die K^+ -Kanal 1.5 (Kv 1.5) Expression

Auch die Kv 1.5 Kanalexpression veränderte sich nicht durch das Fehlen des ER α in weiblichen Tieren (Abbildung 3.45). In männlichen ER α -defizienten Tieren hingegen konnte eine Herunterregulation der Kv 1.5 Kanalexpression um das 3,7-fache festgestellt werden (Abbildung 3.45).

A



B

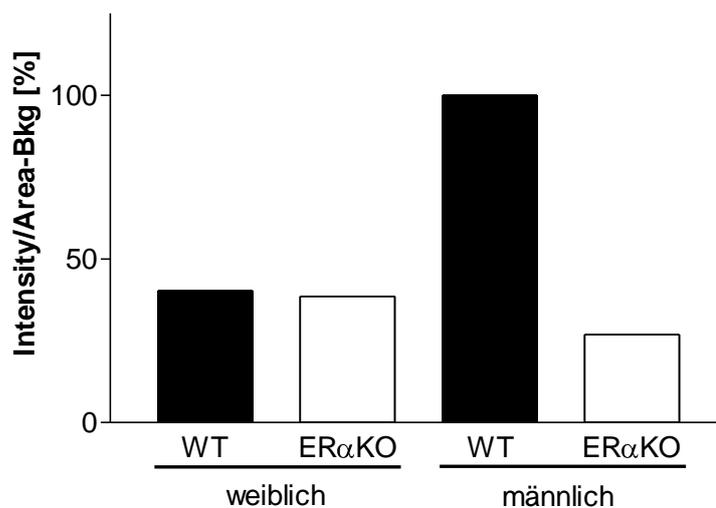


Abbildung 3.45: **Kv1.5 Expression in der cytoplasmatischen Fraktion von weiblichen und männlichen ER α KO und WT Kardiomyozyten**

A zeigt den Kv 1.5-Westernblot. Die Bande bei 66 kDa entspricht Kv 1.5. In den Ansätzen wurden jeweils Zellen aus vier Tieren zusammengefasst. In B ist die densitometrische Auswertung dargestellt.

3.5 Morphologische Parameter

Die auf ihre morphologischen Parameter untersuchten Tiere waren ca. 190 Tage alt. In weiblichen Tieren resultierte die ER α -Defizienz in einer signifikanten Zunahme des Körpergewichtes (KG) um 30% und einer signifikanten Zunahme des linksventrikulären (LV) und rechtsventrikulären Herzgewichts (RVG, Tabelle 3.2). Im Gegensatz dazu waren männliche ER α KO Mäuse geringfügig aber nicht signifikant leichter als die dazugehörigen Kontrollen. Das LVG der männlichen ER α KO war signifikant, das RVG nur leicht verringert (Tabelle 3.2). Insgesamt haben sich die Herzgewichte beider Geschlechter durch die ER α -Defizienz aneinander angeglichen.

Der Vergleich des LVG/KG zwischen weiblichen ER α KO und WT Mäusen (Tabelle 3.2) ergab aufgrund des erhöhten KGs der weiblichen ER α KOs eine signifikante Abnahme dieses Parameters. Das Verhältnis LVG/TL war jedoch in weiblichen ER α KO Tieren signifikant erhöht. In männlichen Tieren führte die ER α -Defizienz zu keiner signifikanten Veränderung dieser Parameter (Tabelle 3.2).

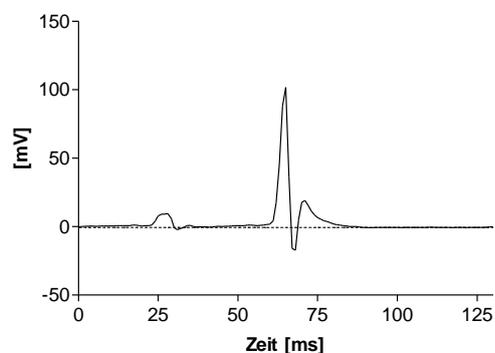
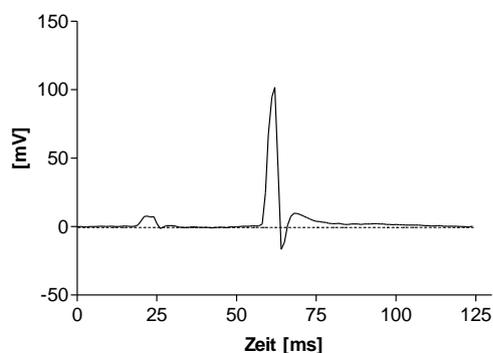
Tabelle 3.2: Mittelwert \pm Standardabweichungen von Alter, Körpergewicht, Tibiallänge und Herzgewichte weiblicher und männlicher ER α KO und WT Mäusen, * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ im Vergleich zum jeweiligen Kontrolltier, # $p < 0,05$ und ## $p < 0,01$ im Vergleich zur Maus des gleichen Genotyps.

	WT		ER α KO	
	♀	♂	♀	♂
Anzahl	21	14	16	10
Alter, Tage	190,1 \pm 26,9	189,9 \pm 6,5	180,1 \pm 44,3	199,9 \pm 31,6
Körpergewicht (KG), g	23,8 \pm 3,9	28,6 \pm 2,3 ^{##}	30,9 \pm 5,7 ^{**}	26,3 \pm 3,1 [#]
Tibiallänge (TL), mm	17,8 \pm 1,1	18,0 \pm 0,7	17,9 \pm 0,7	17,3 \pm 0,4
Linksventrikuläres Gewicht (LVG), mg	68,5 \pm 8,6	93,0 \pm 7,1 ^{##}	80,0 \pm 14,8 ^{**}	81,8 \pm 13,7 [*]
Rechtsventrikuläres Gewicht (RVG), mg	18,6 \pm 2,7	24,3 \pm 3,5 ^{##}	22,45 \pm 4,5 ^{**}	21,1 \pm 4,7
Herzgewicht (HG), mg	87,1 \pm 10,3	117,2 \pm 8,4 ^{##}	102,5 \pm 18,4 ^{**}	102,8 \pm 16,5 [*]
LVG/KG, mg/g	2,9 \pm 0,4	3,3 \pm 0,3 [#]	2,6 \pm 0,3 ^{**}	3,1 \pm 0,3 ^{##}
LVG/TL, mg/mm	3,9 \pm 0,5	5,2 \pm 0,4 ^{##}	4,5 \pm 0,7 ^{**}	4,7 \pm 0,8
HG/TL, mg/mm	4,9 \pm 0,6	6,5 \pm 0,5 ^{##}	5,7 \pm 0,9 ^{**}	5,9 \pm 0,9

3.6 Elektrokardiogramm

Die Herzfrequenz (Hf) der im EKG untersuchten Mäuse variierte im Bereich von 460 bis 490 Schlägen/min (Tabelle 3.3). Die Hf der narkotisierten Tiere unterschieden sich nicht signifikant voneinander. In Abbildung 3.46 sind repräsentative Maus-EKGs weiblicher Tiere dargestellt. Die Maus-EKGs männlicher Tiere entsprechen in ihrer Ausprägungsformen weitestgehend denen der weiblichen Aufzeichnungen und sind daher nicht gezeigt. Ein typisches Merkmal von Maus-EKGs ist der direkte Übergang von S-Zacke in die T-Welle. Die in humanen EKGs ausgebildete ST-Strecke fehlt.

A



B

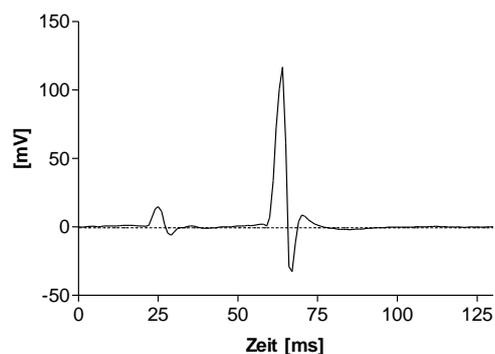
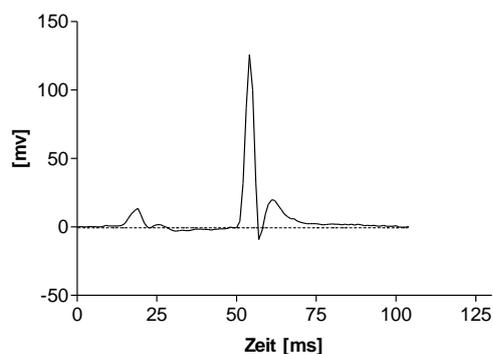


Abbildung 3.46: Charakteristische EKG Aufzeichnungen von weiblichen ERaKO und WT Mäusen

A zeigt 50 über die R-Zacke gemittelte EKGs weiblicher WT Mäuse und B weiblicher ERaKO Tiere. Im linken Teilbild ist jeweils ein unipolarer Verlauf und im rechten Teilbild ein bipolarer Verlauf der T-Welle dargestellt. Die Hf der untersuchten Tiere waren in A links 480 und rechts 484 Schläge/min, in B links 571 und rechts 451 Schläge/min. In Maus-EKGs schließt sich die T-Welle direkt an die S-Zacke an. Männliche EKG Aufzeichnungen entsprechen denen weiblicher Tiere.

In beiden Geschlechtern wurde weder die PR Dauer noch der QRS-Komplex durch die ER α -Defizienz beeinflusst (Tabelle 3.3). In weiblichen Tieren bewirkte die ER α -Defizienz ein signifikant verkürztes QT-Intervall. Die QT-Dauer unterschied sich in den männlichen Untersuchungsgruppen kaum voneinander (Tabelle 3.3).

*Tabelle 3.3: EKG Parameter weiblicher und männlicher WT und ER α KO Mäuse. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe; # $p < 0,05$ im Vergleich zum gleichen Genotyp.*

	WT		ER α KO	
	♀	♂	♀	♂
Anzahl	19	23	13	18
Hf, Schläge/min	475,5 \pm 60,7	494,5 \pm 80,6	487,0 \pm 62,6	460,7 \pm 92,1
PR, ms	40,2 \pm 3,2	37,8 \pm 4,1	38,4 \pm 1,9	39,7 \pm 3,2
QT, ms	57,5 \pm 16,0	47,1 \pm 10,4 [#]	47,0 \pm 10,0 [*]	49,0 \pm 17,1
QT _c , ms	50,5 \pm 12,0	42,6 \pm 9,9 [#]	42,2 \pm 8,7 [*]	42,2 \pm 13,0
QRS, ms	10,5 \pm 1,4	10,6 \pm 1,1	10,0 \pm 1,1	10,7 \pm 1,6

Auch das frequenzkorrigierte QT-Intervall (QT_c) war in weiblichen $ER\alpha$ KO Tieren verkürzt. In männlichen Tieren beeinflusste die $ER\alpha$ -Defizienz das QT_c -Intervall nicht (Abbildung 3.47). Ein Vergleich der Mittelwerte der WTs ergab ein signifikant verlängertes QT- und QT_c -Intervall in den weiblichen Mäusen (Abbildung 3.47 und Tabelle 3.3). Die $ER\alpha$ -Defizienz reduzierte die QT- und QT_c -Dauer auf die Werte männlicher Tiere.

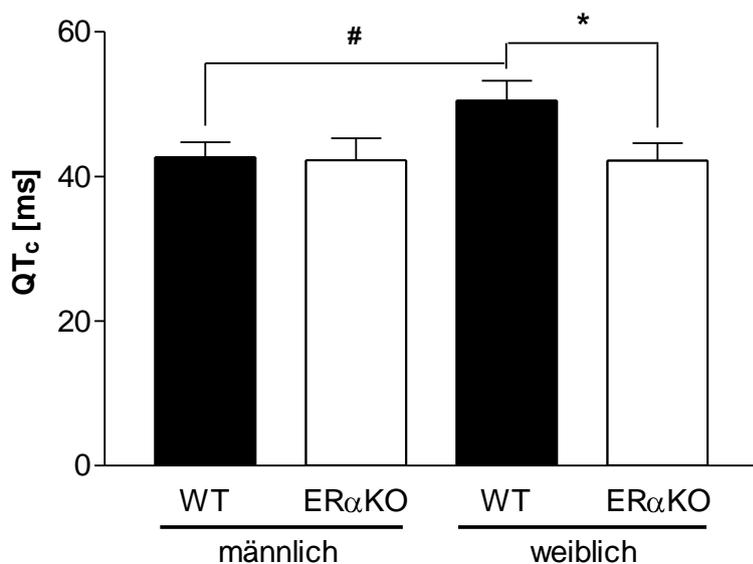


Abbildung 3.47: Frequenzkorrigiertes QT-Intervall (QT_c) von weiblichen und männlichen $ER\alpha$ KO und WT Mäusen

Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 13-23 Tieren. Das QT-Intervall wurde nach MITCHELL et al. (1998) frequenzkorrigiert. Das Fehlen des $ER\alpha$ reduzierte das QT_c in weiblichen Mäusen. * $p < 0,05$ im Vergleich zum WT; # $p < 0,05$ im Vergleich zum gleichen Genotyp.

3.7 Hämodynamik

3.7.1 Peripherer Blutdruck

Die ER α -Defizienz wirkte sich geschlechtsabhängig auf den systolischen arteriellen Blutdruck (SBP) aus (Abbildung 3.48). Der Mittelwertvergleich der männlichen und weiblichen WT Werte ergab einen signifikant höheren SBP in männlichen als in weiblichen WT Mäusen. In männlichen Tieren reduzierte das Fehlen des ER α den SBP signifikant, in weiblichen nur geringfügig. Der ER α KO verminderte den SBP in männlichen Mäusen auf das Niveau weiblicher Tiere.

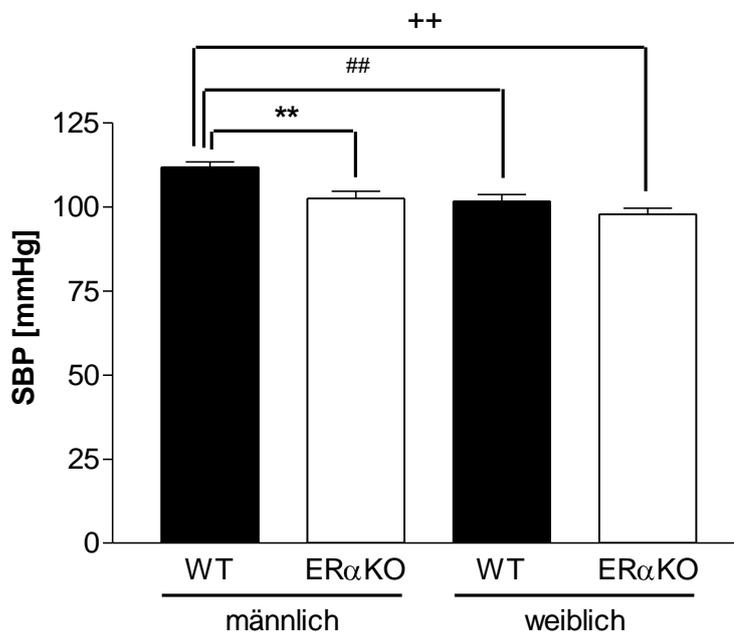


Abbildung 3.48: Systolischer arterieller Blutdruck weiblicher und männlicher ER α KO und WT Mäuse
Die Messung des systolischen arteriellen Blutdrucks (SBP) erfolgte in der A. carotis communis dextra mithilfe eines Millar Katheters. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 14-25 Tieren. Das Fehlen des ER α reduzierte in männlichen Mäusen den SBP. ** $p < 0,01$ im Vergleich zum WT; ## $p < 0,01$ im Vergleich zum gleichen Genotyp; ++ $p < 0,01$ WT, m im Vergleich zu ER α KO, w.

Die Untersuchung des arteriellen diastolischen Blutdruckes (DBP, Abbildung 3.49) zeigte dem SBP ähnliche Verhältnisse auf. Männliche WT Mäuse entwickelten einen signifikant höheren DBP als weibliche WT Tiere. Der DBP war in männlichen ER α KO signifikant reduziert, in weiblichen nur geringfügig. Die ER α -Defizienz senkte den DBP in männlichen WTs auf die Werte weiblicher WT Mäuse.

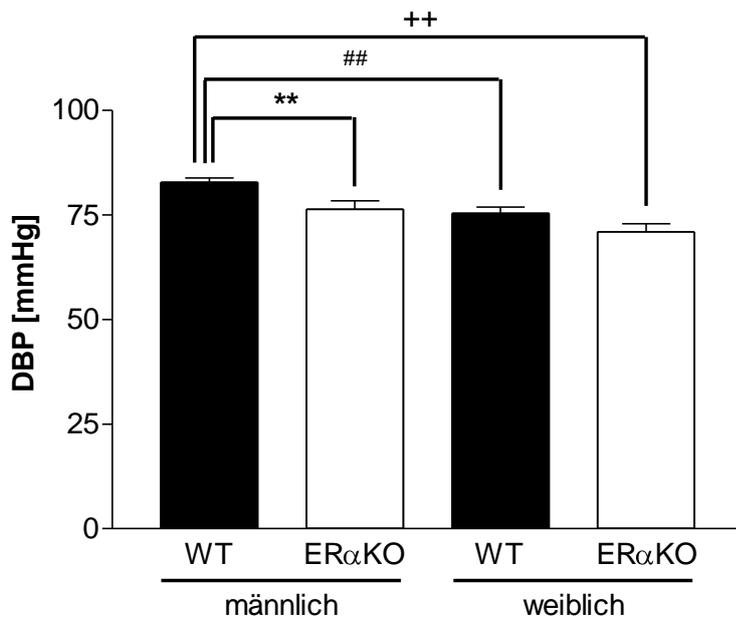


Abbildung 3.49: Diastolischer arterieller Blutdruck weiblicher und männlicher ER α KO und WT Mäuse
 Die Messung des diastolischen arteriellen Blutdrucks (DBP) erfolgte in der A. carotis communis dextra mithilfe eines Millar Katheters. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 14-25 Tieren. Das Fehlen des ER α reduzierte in männlichen Mäusen den DBP. ** $p < 0,01$ im Vergleich zum WT; ## $p < 0,01$ im Vergleich zum gleichen Genotyp; ++ $p < 0,01$ WT, m im Vergleich zu ER α KO, w.

Der in männlichen WT und ER α KO Mäusen gemessene mittlere arterielle Blutdruck (MABP) war signifikant höher als in weiblichen Tieren gleichen Genotyps. In männlichen ER α KO Mäusen war der MABP gegenüber den männlichen Kontrollen signifikant erniedrigt (Abbildung 3.50). In weiblichen ER α KO konnte nur eine nicht signifikante MABP Verminderung festgestellt werden.

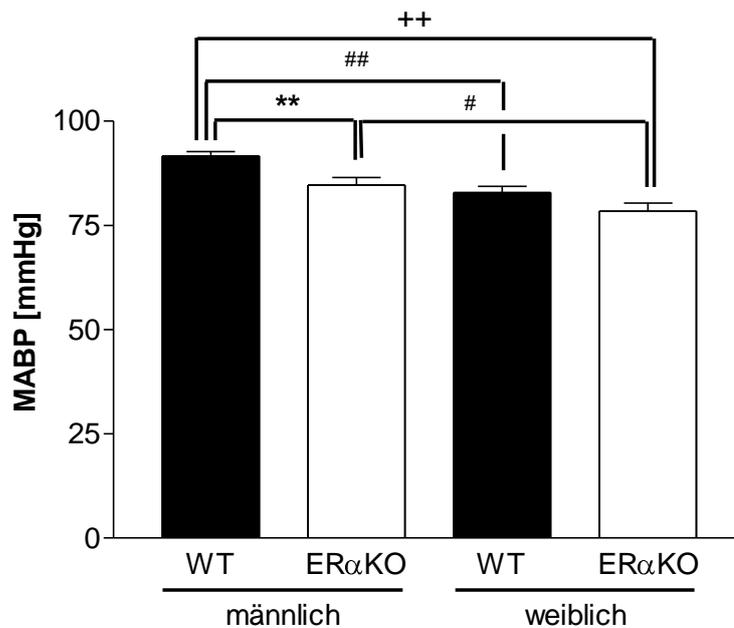


Abbildung 3.50: Mittlerer arterieller Blutdruck weiblicher und männlicher ER α KO und WT Mäuse
 Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 14-25 Tieren. Das Fehlen des ER α reduzierte in männlichen Mäusen den MABP. ** $p < 0,01$ im Vergleich zum WT; # $p < 0,05$ und ## $p < 0,01$ im Vergleich zum gleichen Genotyp; + $p < 0,05$ WT, m im Vergleich zu ER α KO, w.

3.7.2 Herzfrequenz und linksventrikulärer Druck

Die Herzfrequenz der narkotisierten Tiere lag zwischen 507 und 558 Schlägen pro Minute (WT, w: 515 ± 56 ; ER α KO, w: 507 ± 53 ; WT, m: 558 ± 58 ; ER α KO, m: 550 ± 46). Zwischen den Untersuchungsgruppen konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Die Unterschiede zu den in Kapitel 3.6 gemessenen Herzfrequenzen resultieren vermutlich aus unterschiedlichen Narkosetiefen.

Männliche WT Mäuse hatten einen signifikant höheren linksventrikulären systolischen Druck (LVSP) als weibliche Kontroll-Mäuse (Abbildung 3.51). In männlichen ER α KO Mäusen war der LVSP im Vergleich zu den männlichen Kontrollen signifikant verringert. Der Mittelwertvergleich weiblicher LVSP ergab keine signifikanten Veränderungen.

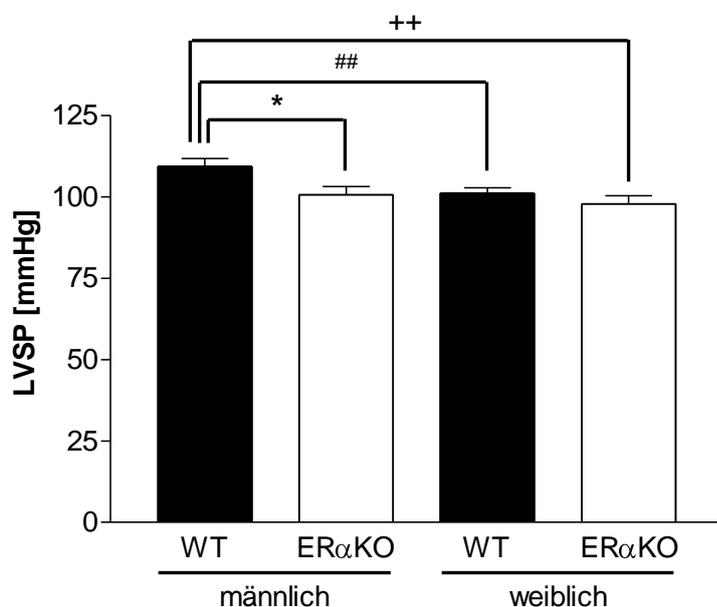


Abbildung 3.51: Linksventrikulärer systolischer Druck weiblicher und männlicher ER α KO und WT Mäusen

Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 8-18 Tieren. Das Fehlen des ER α führt in männlichen Mäusen zu einer Senkung des linksventrikulären systolischen Drucks (LVSP). * $p < 0,05$ im Vergleich zum WT; $^{\#}p < 0,05$ und $^{\#\#}p < 0,01$ im Vergleich zum gleichen Genotyp; $^{++}p < 0,01$ WT, m im Vergleich zu ER α KO, w.

Der linksventrikuläre diastolische Druck (LVDP) unterschied sich nicht signifikant in weiblichen und männlichen WT Tieren (WT, w: $0,1 \pm 2,5$ mmHg vs. WT, m: $-1,5 \pm 4,4$ mmHg). Auch die ER α -Defizienz beeinflusste nicht den LVDP (ER α KO, w: $-1,8 \pm 2,2$ mmHg vs. WT, w: $0,1 \pm 2,5$ mmHg ER α KO, m: $-4,4 \pm 3,5$ mmHg vs. WT, m: $-1,5 \pm 4,4$ mmHg) in beiden Geschlechtern.

3.7.2.1 Maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit

Sowohl die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (LV dP/dt_{max}) als auch die linksventrikuläre maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (LV dP/dt_{min}) war in $ER\alpha$ -defizienten Tieren beider Geschlechter verringert (Abbildung 3.52). Die Geschwindigkeitsabfälle waren jedoch nicht signifikant.

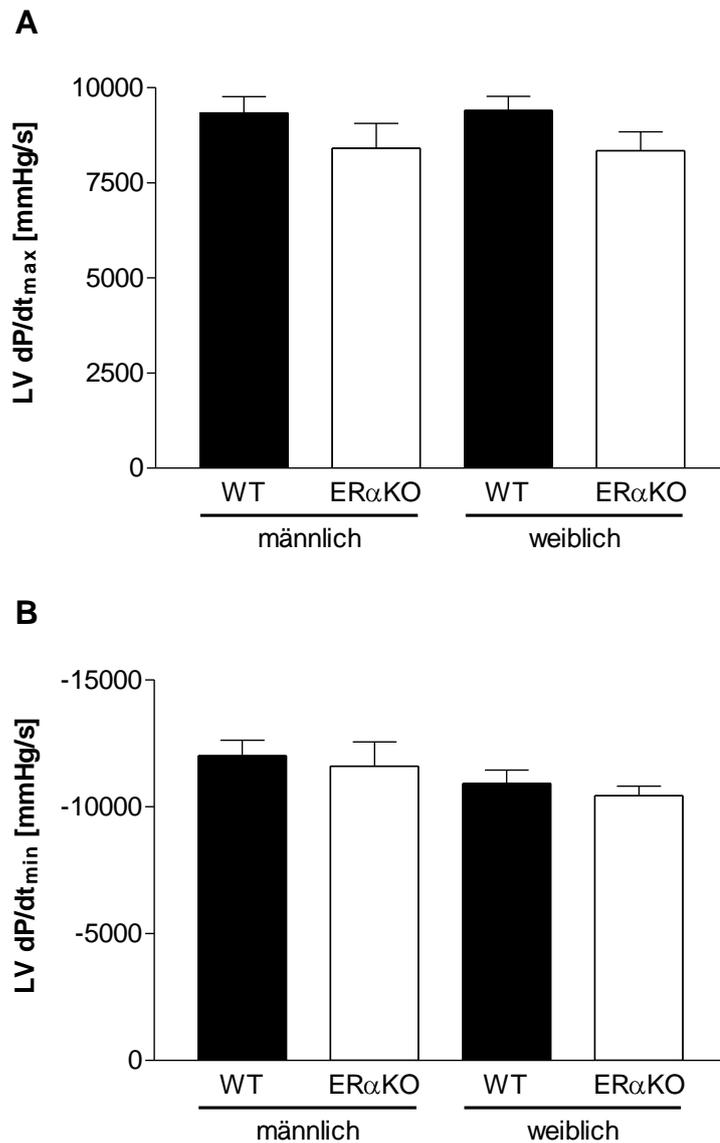


Abbildung 3.52: Maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit weiblicher und männlicher $ER\alpha$ KO und WT Mäuse
Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 8-18 Tieren. Das Fehlen des $ER\alpha$ führt in beiden Geschlechtern zu einer nicht signifikanten Erniedrigung der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (LV dP/dt_{max} , A) und linksventrikulären maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit (LV dP/dt_{min} , B).

3.7.3 Herzfrequenz und linksventrikulärer Druck bei Dobutamin-Stimulation

Die Dobutamin-Stimulation übte keine unterschiedlichen Einflüsse auf die Herzfrequenz der ER α KO und WT Mäuse aus (Abbildung 3.53). Die signifikante Zunahme der Herzfrequenz ($p < 0,001$) beider Genotypen war auf die ansteigende Dobutamin-Konzentration zurückzuführen.

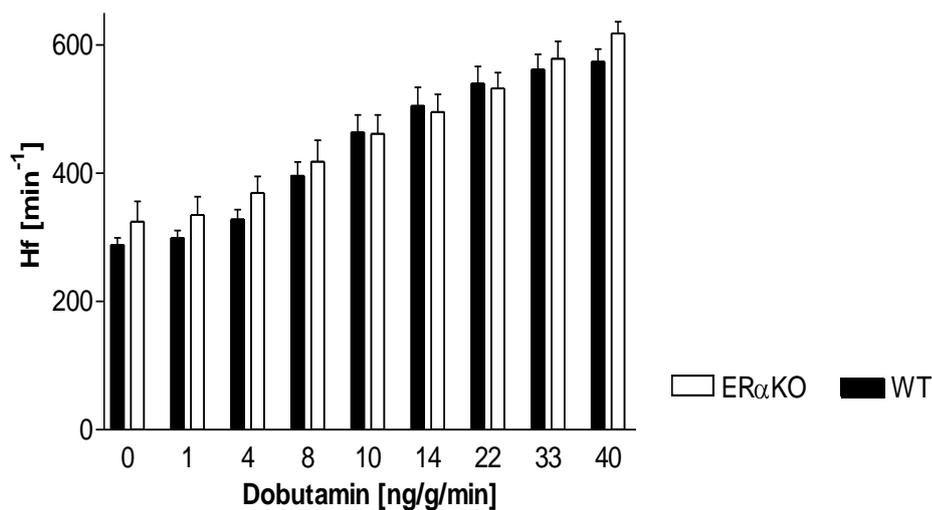


Abbildung 3.53: Herzfrequenz weiblicher ER α KO und WT Mäuse unter Dobutamin-Stimulation

Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 7 ER α KO und 11 Kontrolltieren. Die Applikation von Dobutamin in ansteigender Konzentration führte zu einem Herzfrequenzanstieg unabhängig vom Genotyp der Maus.

Die Dobutamin-Stimulation bewirkte in der Zweifache Anova eine signifikante Veränderung des linksventrikulären systolischen Druckes ($p < 0,001$, Abbildung 3.54), die sich in einer Einzelanalyse nach Bonferoni auf einen Anstieg im LVSP nach Applikation von 4, 8 und 10 ng/g/min Dobutamin in den weiblichen ER α KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren zurückführen ließ.

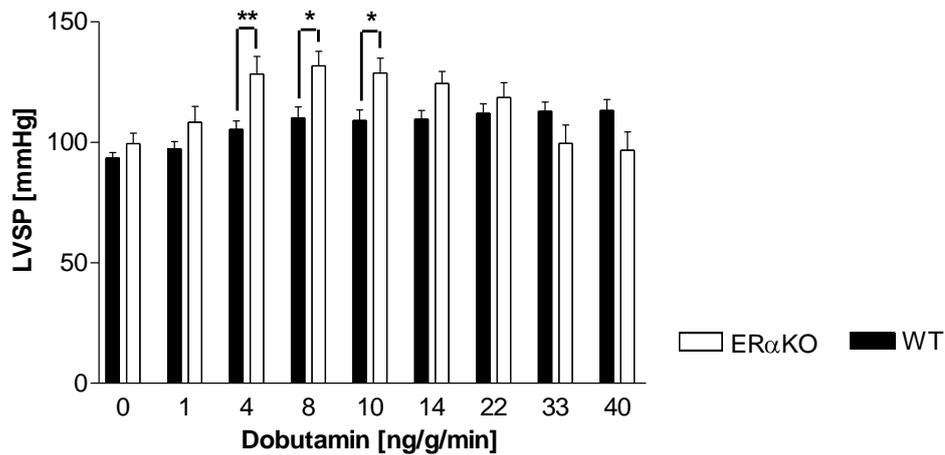
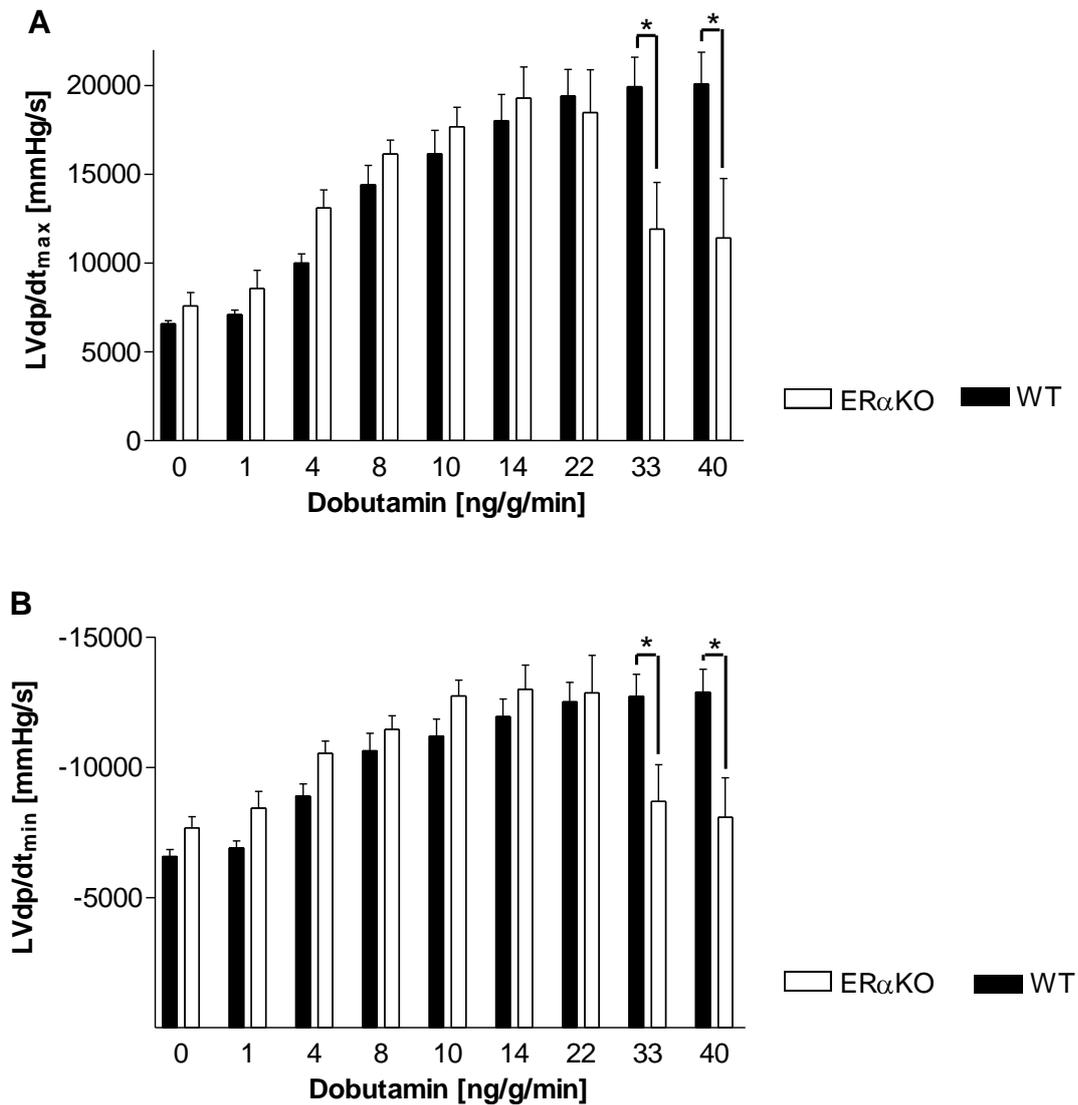


Abbildung 3.54: Linksventrikulärer systolischer Druck weiblicher ER α KO und WT Mäuse unter Dobutamin-Stimulation

Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 7 ER α KO und 11 Kontrolltieren. Die Dobutamin-Applikation von 4, 8 und 10 ng/g/min führte zu einem signifikant höheren linksventrikulären Druckanstieg in ER α KO Tieren, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

3.7.3.1 Maximale Druckerstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeit bei Dobutamin-Stimulation

Die $LVdp/dt_{max}$ und $LVdp/dt_{min}$ (Abbildung 3.55) veränderte sich in der Zweifach-Anova ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) während der Intervention. Die Einzelanalyse nach Bonferoni ergab bei der Applikation von 33 und 40 ng/g/min Dobutamin eine signifikant verringerte $LVdp/dt_{max}$ und $LVdp/dt_{min}$ in den $ER\alpha KO$ Tieren im Vergleich zu den WT Mäusen.



4 Diskussion

4.1 Myozytäre Kontraktilität isolierter muriner Kardiomyozyten

Im Rahmen dieser Studie wurde die kardiale Kontraktilität muriner Kardiomyozyten als Sarkomerverkürzung gemessen. Die Sarkomerverkürzungsmessung ist gegenüber der Zellverkürzungsmessung zu bevorzugen, da diese von der Zellgröße unabhängig ist. Diese Methode erlaubt einen direkten Vergleich zwischen einzelnen Zellen (MUKHERJEE et al., 1993).

Die unbelastete Verkürzung isolierter Kardiomyozyten wird häufig als Maß für die kardiale Kontraktilität gemessen (DELBRIDGE & ROOS, 1997). Die grundlegenden kontraktiven Parameter wie Verkürzungs-Frequenzverhalten und „Post Rest“ Verhalten dieser Messungen sind mit den Ergebnissen von Kraftaufnahmen von kardialen Muskelstreifen vergleichbar, z.B. waren Veränderungen der Verkürzungs-Frequenz-Beziehung isolierter Kardiomyozyten vergleichbar den Veränderungen der Kraft-Frequenz-Beziehung in kardialen Muskelstreifen (BRIXIUS et al., 2001).

Grundvoraussetzung für optische Sarkomerverkürzungsmessungen sind Kardiomyozyten hoher Qualität. Die verwendeten Kardiomyozyten zeigten eine ausgeprägte Querstreifung. Unter physiologischen Bedingungen (36°C, 1,8 mM Ca²⁺) lagen die Ruhesarkomerlängen zwischen 1,81 und 1,89 µm. Die Messbarkeit der Zellen bis einschließlich 10 Hz Stimulationsfrequenz zeigt, dass das eingesetzte Isolationsverfahren die für die Kontraktion und Relaxation benötigten strukturellen Komponenten kaum beeinträchtigte.

Vergleichbare Ergebnisse erzielten nur LIM et al. (2000). Die von dieser Arbeitsgruppe gemessenen Ruhesarkomerlängen von 1,72 µm waren im Vergleich zu Werten in der vorliegenden Studie um 5-10 % vermindert. Stimulationsfrequenzen bis 9 Hz sprechen jedoch für die Qualität der von LIM et al. verwendeten Zellen.

Die außergewöhnliche Qualität der in dieser Studie eingesetzten Ventrikelmyozyten ermöglichte *in vitro* Untersuchungen im Frequenzbereich der Ruheherzfrequenz der Maus. Die physiologische Ruheherzfrequenz der Maus liegt bei 550 bis 600 Schlägen pro Minute. Dies entspricht einer Stimulationsfrequenz von 9 bis 10 Hz. Eine höhere Kont-

raktionsrate konnten nicht erreicht werden, ohne dass die Zellen mit ihrer Refraktärperiode interferierten.

4.1.1 Die Frequenzabhängigkeit der Kontraktilität muriner Kardiomyozyten

4.1.1.1 Zum Einfluss der Frequenz auf die Ausbildung des Treppenphänomens nach einer Stimulationspause

Nach einer Stimulationspause ist bei Kardiomyozyten die Ausbildung einer Herzterappe (sog. Treppenphänomen) bis zum Erreichen eines neuen Gleichgewichtszustandes der Kontraktion zu beobachten. Der Verlauf der Herzterappe ist u.a. speziesabhängig. Herzmuskelstreifen vom Frosch (NIEDERGERKE, 1956), Herzmuskeltrabekel vom gesunden Menschenherz (PIESKE et al., 1999) und Kaninchenherz (MAIER et al., 2000) bilden eine positive Herzterappe aus, d.h. die Kontraktionsamplitude nimmt von Schlag zu Schlag zu bis ein frequenzabhängiges Gleichgewicht erreicht wird. Experimente an Ratten liefern unterschiedliche Ergebnisse. BERS (2001) beschreibt negative Herztreppen, während BORZAK et al. (1991) im niedrigeren Frequenzbereich die Entwicklung einer negativen Herzterappe und im höheren Frequenzbereich die einer positiven Herzterappe zeigt.

Die vorliegende Studie entdeckte bei murinen Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen ebenfalls frequenzabhängige Unterschiede in der Ausbildung der Herzterappe nach einer Stimulationspause (Abbildung 3.6). Bis 4 Hz Stimulationsfrequenz fällt die Verkürzungsamplitude bis zum Erreichen eines neuen Gleichgewichtszustandes in Form einer negativen Herzterappe kontinuierlich ab. In höheren Frequenzbereichen (6-10 Hz) erhöht sich die Verkürzungsamplitude in Form einer positiven Herzterappe bis zum Einstellen eines neuen Gleichgewichtszustandes (Abbildung 3.6). Die initiale Verkürzung nach einer Stimulationspause, die „Post Rest“ Verkürzung, besitzt in allen Frequenzbereichen die größte Amplitude.

Die frequenzabhängige Änderung des Treppenphänomens stellt somit eine Besonderheit von Maus und Ratte dar.

4.1.1.2 Die Kraft-Frequenz-Beziehung im Gleichgewichtszustand bei murinen Kardiomyozyten

Die Kraft-Frequenz-Beziehung ist ein wichtiger intrinsischer Regulationsmechanismus der kardialen Kontraktilität. Es ermöglicht dem Herzen in Kombination mit dem Frank-

Starling-Mechanismus, seine Pumpleistung an veränderte physiologische Bedingungen des Körpers anzupassen.

In den meisten Säugetieren wie z.B. in Kaninchen (ENDO, 2004), Katzen (VILA PETROFF et al., 2003), Meerschweinchen (KURATOMI et al., 2003) und Menschen (PIESKE et al. 1999) ist eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung im Gleichgewichtszustand zu beobachten. Der Anstieg der Reizfrequenz wirkt am Herzen positiv inotrop. Die Ausprägung der Kraft-Frequenz-Beziehung bei Mäusen und Ratten ist unterschiedlich. BERS (2000) und MAIER et al. (2000) beschreiben eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung, während andere Autoren von einer positiven (GAO et al., 1998; LAYLAND & KENTISH, 1999; ANTOONS et al. 2002) oder biphasischen Kraft-Frequenz-Beziehung (BORZAK et al., 1991; ITO et al., 2000; LIM et al., 2000; REDEL et al., 2002; STUYVERS et al. 2002) berichten.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen bei adulten murinen Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen eine biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung erkennen (Abbildung 3.2). Im niedrigen Frequenzbereich (0,5-2 Hz) verminderte sich die Verkürzungsamplitude des Gleichgewichtszustandes bis zu einem Minimum bei 2 Hz. ENDO (2004) bezeichnet dies als die „erste Phase“ negative Kraft-Frequenz-Beziehung. Mit steigender Stimulationsfrequenz (>2 Hz) erhöhten sich die Werte der Verkürzungsamplitude des Gleichgewichtszustandes. Murine Kardiomyozyten entwickeln also in höheren Frequenzbereichen die in größeren Säugetieren beobachtete positive Kraft-Frequenz-Beziehung. Ab 8 Hz Stimulationsfrequenz reduzierte sich die Sarkomerverkürzungsamplitude geringfügig wieder. Diese Verminderung wird als die „zweite Phase“ negative Kraft-Frequenz-Beziehung bezeichnet (ENDO, 2004). Murine Kardiomyozyten prägen also eine biphasische Verkürzung-Frequenz-Beziehung aus.

Untersuchungen an Mäusen und Ratten bestätigen weitestgehend die erhaltenen Ergebnisse (BORZAK et al., 1991; ITO et al., 2000; LIM et al., 2000; STUYVERS et al., 2002). Herzmuskeltrabekel von Mäusen entwickeln im Frequenzbereich zwischen 0,1 und 4,6 Hz eine biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung mit einem Minimum bei 0,7 Hz (25°C) bzw. 1 Hz (37°C) (STUYVERS et al., 2002). Zellverkürzungsmessungen an isolierten Kardiomyozyten von ITO et al. (2000) sowie LIM et al. (2000) verifizieren die biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung muriner Kardiomyozyten, jedoch auch mit einem Minimum

bei 1 Hz Stimulationsfrequenz. Die Verschiebungen der Kraft-Frequenz-Beziehung in niedrigere Frequenzbereiche sind auf unterschiedliche Versuchstemperaturen und Calciumkonzentrationen zurückzuführen.

LIM et al. (2000) weisen an isolierten ventrikulären Myozyten der Maus eine Abhängigkeit der Verkürzungs-Frequenz-Beziehung von der Temperatur nach. Bei 37°C Untersuchungstemperatur trat im Frequenzbereich zwischen 0,2 und 9 Hz eine biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung mit einem Minimum bei 2 Hz auf. Bei Raumtemperatur verschob sich das Minimum in niedrigere Frequenzbereiche (1 Hz). Nach einem kurzen Anstieg der Zellverkürzungsamplitude (2 Hz), war mit steigender Frequenz nur eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung zu beobachten. Neben der Verschiebung des Minimums der Kraft-Frequenz-Beziehung limitieren nicht-physiologische Temperaturen (Raumtemperatur, 25°C, 27°C) die Frequenzhöhe der zu applizierenden Stimuli. An isolierten Papillarmuskeln der Maus konnten Kraft-Frequenz-Messungen nur bis 5 Hz Stimulationsfrequenz durchgeführt werden. Die lange Kontraktionsdauer bei 27°C führte zu einer unvollständigen Relaxation (REDEL et al., 2002). Unter Berücksichtigung eines Temperaturkoeffizienten Q_{10} von 2,5 entsprechen Untersuchungsergebnisse bei 4 Hz und 27°C den Werten von 10 Hz bei 37°C Versuchstemperatur (REDEL et al., 2002). Diese Annahme ermöglicht es, die Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen miteinander zu vergleichen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie stellten GAO et al. (1998) und ANTOONS et al. (2002) eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung bei Mäusen fest. Die zu dieser Studie unterschiedlichen Untersuchungsdesigns sollten nicht außer Acht gelassen werden. Die von ANTOONS et al. (2002) durchgeführten Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 30°C im Frequenzbereich zwischen 1 und 4 Hz mit einer externen Calciumkonzentration von 1 mM. GAO et al. (1998) stimulierten die Zellen im Frequenzbereich zwischen 0,2 und 4 Hz bei Raumtemperatur mit einer externen Calciumkonzentration von 2 mM.

Abschließend ist festzuhalten, dass murine Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen eine biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung ausprägen. Die Unterschiede in der Ausprägungsform der Kraft-Frequenz-Beziehung bei Mäusen resultieren möglicher-

weise aus unterschiedlichen Temperaturen und externen Calciumkonzentrationen (vgl. Kapitel 4.1.2).

4.1.1.3 Mechanismen der frequenzabhängigen Kontraktilität muriner Kardiomyozyten

Das intrazelluläre Calcium ist der zentrale Regulator der kardialen Kontraktilität. Veränderungen der systolischen intrazellulären Calciumkonzentration und der gespeicherten Ca^{2+} Menge im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) liegen der frequenzabhängigen Ausbildung der Herztreppen (Kapitel 4.1.1.1) und der biphasischen Kraft-Frequenz-Beziehung (Kapitel 4.1.1.2) zu Grunde. Speziesabhängige Unterschiede in der Beteiligung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA 2a) zur Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase in der Zelle könnten eine mögliche Erklärung für die in der Maus und Ratte beobachtete Ausbildung der negativen Herztreppe und der biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung sein. Mit 90,3 % ist die SERCA 2a der dominierende Transportmechanismus zur Entfernung des Calciums aus dem Cytosol. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher stellt mit 9,2 % das zweit effektivste System in der Maus-Kardiomyozyte dar (BERS, 2001). In der Kaninchen Kardiomyozyte liegt hingegen der Beitrag der SERCA 2a nur bei 70%, die des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bei 28% (BERS, 2001).

In Mäusen und Ratten ist die Ruhecalciumkonzentration im SR im Vergleich zu Säugetieren mit monophasischer Kraft-Frequenz-Beziehung relativ hoch (BERS, 2000; BERS, 2001). Mäuse und Ratten entwickeln daher eine potenzierte „Post Rest“ Kontraktion (MAIER et al., 2000; BERS, 2001). Diese resultiert möglicherweise aus einer relativ hohen intrazellulären Natriumkonzentration, die in Ruhe den Ca^{2+} -Efflux via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher limitiert (SHATTOCK & BERS, 1989; YAO et al., 1998). Während der folgenden Kontraktionen ist die interne Calciumkonzentration erhöht, so dass eine starke „driving force“ besteht, die Ca^{2+} via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus der Zelle entfernt. Dieser Ca^{2+} -Efflux führt zur Ausbildung der negativen Herztreppe im niedrigen Frequenzbereich (BERS, 2001) und bedingt bei niedrigen Stimulationsfrequenzen eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung. Untersuchungen von NAMEKATA et al. (2004, zitiert nach ENDOH, 2004) unterstützen diese Annahme. Ein neuer Inhibitor des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, SEA0400, unterdrückt die erste Phase negative Kraft-Frequenz-Beziehung. Die Applikation von 100 nM Ryanodin, welches zu einem Ca^{2+} -Verlust des SRs führt, kehrte in isolierten Ratten-Kardiomyozyten die biphasische Kraft-Frequenz-Beziehung in eine posi-

tive Kraft-Frequenz-Beziehung (BORZAK et al., 1991) um. Basierend auf diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass die hohe Ruhefüllung des SRs bedingt durch die im Verhältnis zur SERCA 2a geringe Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in Ruhe die beobachtete Entwicklung der negativen Herzterappe und der negativen Kraft-Frequenz-Beziehung im niedrigen Frequenzbereich verursacht.

Die in höheren Frequenzbereichen (>2 Hz) beobachtete positive Kraft-Frequenz-Beziehung und positive Herzterappe ist auf einen erhöhten intrazellulären Calciumtransienten bei höheren Stimulationsfrequenzen zurückzuführen. Dieser Zusammenhang wurde von mehreren Arbeitsgruppen als ein gesichertes Ergebnis dargestellt (GAO, et al., 1998; LAYLAND et al., 1999; LIM et al., 2000; ANTOONS et al., 2002). Der Anstieg des Calciumtransienten war jedoch im Vergleich zur Kontraktion weniger ausgeprägt (GAO, et al., 1998; ANTOONS et al., 2002). Daher könnte eine frequenzabhängige Ca^{2+} -„Sensitivierung“ der Myofilamente die positive Inotropie mit verursachen.

Eine Erhöhung des intrazellulären Calciumtransienten ist u.a. möglich durch einen gesteigerten Calciumeinstrom. Studien sowohl an Maus-Herzmuskeltrabekel als auch an isolierten Ratten-Kardiomyozyten untersuchten den Einfluss des spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanal auf die frequenzabhängige positive Inotropie (BORZAK et al., 1991; STUYVERS, et al., 2002). Blockierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals mittels Verapamil und/oder Nifedipin kehrten die positive Kraft-Frequenz-Beziehung in eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung um. Die Autoren vermuten daher eine Ca^{2+} Akkumulation im SR vermittelt über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal. Voltage-clamp-Untersuchungen an isolierten murinen Kardiomyozyten wiesen jedoch einen Abnahme des Spitzencalciumstromes mit steigender Frequenz nach (ANTOONS et al., 2002). Die Autoren führen dies auf eine unvollständige Erholung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im hohen Frequenzbereich zurück. Dennoch erhöhte sich der Netto Ca^{2+} -Influx pro Zeit, der zu einem Anstieg des SR Ca^{2+} Gehaltes führte.

Die Erhöhung des Calciumgehaltes erfolgt, wenn der Calciumeinstrom den Calciumausstrom übersteigt. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist hauptverantwortlich für den Ca^{2+} -Efflux in murinen Kardiomyozyten. Mit steigender Frequenz vermindert sich die Zeit der Zelle im diastolischen Membranpotentialbereich. Außerdem kommt es vermutlich zu

einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Beide Faktoren begünstigen einen verminderten Calciumaustransport.

Ein weiterer Mechanismus zur Steigerung des SR Ca^{2+} Gehaltes stellt die Aktivitätserhöhung der SERCA 2a dar. Die Aktivität der SERCA 2a wird durch das inhibitorische Protein Phospholamban (PLB, KOSS & KRANIAS, 1996) reguliert. Dieses Ca^{2+} regulatorische Protein scheint maßgeblich an der Ausprägung der Kraft-Frequenz-Beziehung beteiligt zu sein. Phospholamban-defiziente Mäuse entwickelten eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Zusätzlich fehlte den Papillarmuskeln von PLB-defizienten Mäusen die Möglichkeit auf einen Frequenzanstieg mit einer Beschleunigung der Kontraktion zu reagieren (BLUHM et al., 2000). Des Weiteren zeigten MEYER et al. (1999), dass Veränderungen des Phospholamban zu SERCA 2a Verhältnisses die Kraft-Frequenz-Beziehung beeinflussen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die frequenzbedingte positive Inotropie der untersuchten murinen Kardiomyozyten aus einem Zusammenspiel frequenzabhängiger Veränderungen calciumregulierender Proteine resultiert, das letztendlich die systolische intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht.

4.1.2 Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Kontraktilität

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Experimente zum Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_a$) auf die frequenzabhängige Sarkomerverkürzung unter physiologischer Temperatur im Calciumkonzentrationsbereich zwischen 0,9 und 7,2 mM an isolierten murinen Kardiomyozyten durchgeführt (Kapitel 3.1.2).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen logarithmischen Zusammenhang zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_a$ und Verkürzungsamplitude (Abbildung 3.9) und einen Zusammenhang zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_a$ und Verkürzungs- bzw. Relaxationsgeschwindigkeit (Abbildung 3.10) auf. Eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_a$ wirkt positiv inotrop und lusitrop. Aufgrund der Beschleunigung der Verkürzung und Relaxation bleibt die Verkürzungsdauer bei variierenden $[\text{Ca}^{2+}]_a$ nahezu unverändert (Abbildung 3.11). Des Weiteren bewirkt eine Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_a$ eine Abflachung der negativen Herztreppe im niedrigen Frequenzbereich (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Der Verlauf der Verkürzungs-Frequenz-Beziehung ist ebenfalls von der $[\text{Ca}^{2+}]_a$ abhängig. Murine Kardiomyozyten bilden bei 0,9 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$

eine monophasische, bei 1,8 mM $[Ca^{2+}]_a$ eine biphasische und bei 3,6 und 7,2 mM $[Ca^{2+}]_a$ eine triphasische Verkürzungs-Frequenz-Beziehung aus (Abbildung 3.8).

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte von der $[Ca^{2+}]_a$ -abhängige positive Inotropie bestätigte frühere Ergebnisse an Mäusen und Ratten (BORZAK et al., 1991; GAO et al., 1998; ITO et al., 2000). Allerdings erbrachten die älteren Arbeiten keine Erkenntnisse zu Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie Verkürzungsdauer. BORZAK et al. (1991) verzeichneten ebenfalls eine Abflachung der Herztreppe im niedrigen Frequenzbereich. Den Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung betreffend liegen konträre Aussagen vor. Im niedrigen $[Ca^{2+}]_a$ entsprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Untersuchungsergebnissen von GAO et al. (1998) und REDEL et al. (2002), die bei einer $[Ca^{2+}]_a$ von 1,0 mM eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung beobachteten. Abweichende Befunde in einigen der älteren Arbeiten wurden immer bei unphysiologisch niedrigen Temperaturen erhoben und sollen daher hier nicht besprochen werden.

Die Mechanismen der von der $[Ca^{2+}]_a$ abhängigen positiven Inotropie sind unter Kapitel 4.1.1.3 erklärt. Hier sei nur kurz erwähnt, dass die Steigerung der $[Ca^{2+}]_a$ die „driving force“ für Calcium erhöht und somit mehr Calcium pro Zeit in die Zelle einströmt. Daraus resultiert eine Steigerung des intrazellulären systolischen Calciumtransienten (TRAFFORD et al., 2001; GAO et al., 1998; SUDA & KOKUBUN, 1994).

4.1.3 Entwicklungsbedingte Veränderungen der Kontraktilität

Die Kenntnis entwicklungsbedingter Veränderungen kardiovaskulärer Parameter im genetischen Hintergrund von Mauslinien ist wichtig für das Verstehen phänotypischer Veränderungen der kardiovaskulären Parameter von Knockout Mäusen. Diese Studie untersuchte daher C57BL/6 Tiere vier verschiedener Altersgruppen im Alter von 21-362 Tagen (Kapitel 2.1). C57BL/6 stellt den genetischen Hintergrund der untersuchten Östrogenrezeptor-defizienten Mäuse dar.

Diese Studie verzeichnete eine signifikante Zunahme der Sarkomerlänge mit dem Heranwachsen der Tiere (21-169 Tage) und eine Abnahme dieser im zunehmenden Alter (362 Tage).

Entwicklungsbedingte Veränderungen der Sarkomerlänge sind bekannt. NAIR & NAIR (2001) berichten von einer signifikanten Zunahme der Sarkomerlänge in Ratten-Kardio-

myozyten im Alter von zwei bis 12 Monaten. Eine Sarkomerlängenerhöhung wurde ebenfalls in Kaninchen-Kardiomyozyten im Alter von 3 Wochen bis 3 Monaten gefunden (NASSAR et al., 1987). Im Gegensatz dazu entdeckten FRATICELLI et al. (1989) eine Abnahme der Sarkomerlänge in Ratten-Kardiomyozyten im Altersbereich von zwei Monaten bis 25 Monaten. Die Daten von NAIR & NAIR (2001) von 12 monatigen Ratten sind konträr zu denen in dieser Studie erhobenen Daten der entsprechenden Altersklasse. Die Abnahme der Sarkomerlänge in 362 Tage alten Tieren wird jedoch von FRATICELLI et al. (1989) bestätigt.

Das Alter der Tiere beeinflusst die Kontraktilität muriner Kardiomyozyten (Kapitel 3.1.1). Juvenile Kardiomyozyten wiesen eine verringerte Kontraktilität im Vergleich zu adulten Zellen auf. Das Ausmaß der Kontraktilität unterschied sich in den einzelnen Altersgruppen (AG 2-4) der adulten Tiere nicht voneinander, so dass die Ergebnisse dieser gemeinsam betrachtet werden konnten. Die verminderte Kontraktilität äußerte sich sowohl in reduzierten Verkürzungsamplituden in allen Frequenzbereichen, als auch in einer flacheren biphasischen Verkürzungs-Frequenz-Beziehung in juvenilen Kardiomyozyten (Abbildung 3.2). In der Veränderung der biphasischen Verkürzungs-Frequenz-Beziehung spiegelt sich der Einfluss des Alters auf den frequenzabhängigen Verlauf der Herztreppe wieder. Juvenile Kardiomyozyten entwickeln eine positive Herztreppe erst ab 8 Hz aus, adulte Zellen schon ab 6 Hz Stimulationsfrequenz (Abbildung 3.6).

Kardiomyozyten junger Tiere reagierten sehr sensibel auf die enzymatische Isolation. Trotz Anpassung der Enzymkonzentration und Durchlaufzeit (Kapitel 2.2) und hoher Qualitätsansprüche (ausgeprägte Querstreifung, Gestalt, Stimulierbarkeit bis 10 Hz, geringe Spontanaktivität der Zellen) an die untersuchten Zellen kann ein exogener Einfluss, der zur verminderten Kontraktilität der Zellen führte, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Sarkomerlänge, die höher als die der AG 4 ist, unterstreicht jedoch die Qualität der untersuchten juvenilen Kardiomyozyten.

Frühere Experimente an Ratten- und Kaninchen-Kardiomyozyten wiesen ebenso eine graduelle Zunahme der Kontraktilität vom neonatalen bis zum adulten Stadium nach (NASSAR et al., 1987; HUSSE & WUSSLING, 1996; BALAGURU et al., 1997; NAIR & NAIR, 2001). Die verminderte Kontraktilität scheint also durch den Reifegrad der juvenilen Kardiomyozyten bedingt zu sein.

Diese Annahme wird von mehreren Arbeitsgruppen unterstützt. Sie fanden entwicklungsbedingte strukturelle und funktionelle Unterschiede in den an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Komponenten. Neonatale Kardiomyozyten besitzen nur ein gering ausgeprägtes T-Tubulussystem (BRETTE & ORCHARD, 2003). Dies wird innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt angelegt (HADDOCK et al., 1999). Auf diesen Membraninvaginationen befinden sich vermehrt L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die u.a. für die Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung (CICF) relevant sind. Eine Zunahme der Sensitivität der Kontraktilität gegenüber Verapamil, einem Calcium-Kanal-Antagonisten (NAIR & NAIR, 2001) und ein erhöhter Einfluss von Ryanodin auf den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und die Kontraktilität (CHIN et al., 1990; ESCOBAR et al., 2003) mit zunehmenden Alter lassen vermuten, dass die CICF erst mit fortschreitender Entwicklung für die elektromechanische Kopplung an Bedeutung gewinnt. Der Beitrag des SRs zum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verändert sich stark in den ersten drei Wochen nach der Geburt (ESCOBAR et al., 2003). Die Kontraktilität neonataler und juveniler Kardiomyozyten ist im Gegensatz von adulten Kardiomyozyten hauptsächlich vom transsarcolemmalen Ca^{2+} -Influx abhängig (CHIN et al., 1990; VETTER et al., 1995; BALAGURU et al., 1997; ESCOBAR et al., 2003). In neonatalen Ratten-Kardiomyozyten tragen die durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal, T-Typ Ca^{2+} -Kanal und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher einströmenden Calciumionen in etwa gleichen Teilen zur Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei. Nach drei Wochen fließt der Calciuminflux hauptsächlich durch den L-Typ Kanal (ESCOBAR et al., 2003). Die funktionelle Kopplung von L-Typ Ca^{2+} -Kanal mit dem SR nimmt zu. Die SR basierende elektromechanische Kopplung tritt nun in den Vordergrund.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die verminderte Kontraktilität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 21 Tagen alten Kardiomyozyten auf eine noch nicht abgeschlossene nachgeburtliche Reifung zurück zu führen ist. Das SR scheint noch nicht seine volle Funktion übernommen zu haben. Weitere Untersuchungen an Mäusen sind jedoch noch notwendig, da die zitierten Ergebnisse von Kaninchen und Ratten stammen. Die nachgeburtliche Reifung könnte in Mäusen jedoch etwas anders verlaufen, da z.B. spe-ziesabhängige Unterschiede in den an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Komponenten bestehen.

4.2 Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzellen

Die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle ist der Vorgang der Transduktion eines Aktionspotentials (APs) in die Interaktion der kontraktilen Proteine (BERS, 2001). Beteiligte Komponenten sind transmembranäre Ionenströme, Transporter, calciumregulatorische und kontraktile Proteine.

Genomische und nicht-genomische Östrogenrezeptor (ER)-vermittelte Wirkungen von Östrogen (Kapitel 1.2 und Kapitel 1.3) sind bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der genomischen Wirkungen von Östrogen isolierte Kardiomyozyten von ER α - bzw. ER β -defizienten Mäusen als Versuchsobjekt verwendet. In den *in vivo* Untersuchungen spielen zusätzlich noch nicht-genomische-Effekte von Östrogen eine Rolle (Kapitel 4.3). Auf Einzelzellebene ermöglicht die akute Applikation von Östrogen die Beobachtung von nicht-genomisch vermittelten Wirkungen des Östrogens. Nicht-genomische Effekte von Östrogen auf die an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Komponenten wie z.B. SERCA 2a und L-Typ Calciumstrom und die Kontraktilität sind bekannt (JIANG et al., 1992; Grohé et al., 1996; SITZLER et al., 1996; BERGER et al., 1997; LIU et al., 1997; MEYER et al., 1998; NAKAJIMA et al., 1999; LIEW et al., 2003). Ovariectomie Studien, die aufgrund einer Östrogenmangel die genomischen und nicht-genomischen Wirkungen von Östrogen untersuchten, liefern Hinweise, dass 17 β -Östradiol (E2) einen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung ausübt (CURL et al., 2003; REN et al., 2003). Die bisherigen Untersuchungen, mit Ausnahme einer Arbeit von JOHNSON et al. (1997), erlauben jedoch keine Aussage darüber, welcher ER diese Effekte vermittelt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der genomische Einfluss des ER α und ER β auf die elektromechanische Kopplung untersucht. Da geschlechtsspezifische Unterschiede die elektromechanische Kopplung betreffend in adulten Tieren bestehen (CAPASSO et al., 1983; LEBLANC et al., 1998; CURL et al., 2001; TRÉPANIER-BOULAYET et al., 2001; WU & ANDERSON, 2002; VIZGIRDA et al., 2002; JAMES et al., 2004), wurden weibliche und männliche Tiere getrennt untersucht.

4.2.1 Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die Kontraktilität isolierter muriner Kardiomyozyten

Negative inotrope Einflüsse von Östrogen auf die Kontraktilität des Herzens sind bekannt. Die Applikation von 17 β -Östradiol in supraphysiologischer Konzentration redu-

zierte z.B. die Kontraktionskraft von humanen atrialen Herztrabekeln und ventrikulären Papillarmuskeln (SITZLER et al., 1996). Ebenso konnte eine verminderte Zellverkürzung von isolierten Ventrikelmyozyten des Meerschweinchens nach akuter Gabe beobachtet werden (JIANG et al., 1992; LIEW et al., 2003).

Studien an gonadektomierten Tieren überprüften ebenfalls die Rolle von Östrogen für die Kontraktilität des Herzens. Die Ovariectomie induziert eine Östrogenmangel. Hierzu liegen divergente Befunde vor. Ovariectomie führte zu keiner signifikanten Veränderung der Zellverkürzung von Ratten-Kardiomyozyten (HINTZ et al., 2001). Ebenfalls übte es keinen Effekt auf die Kontraktilität von Papillarmuskeln von Kaninchen (PATTERSON et al., 1998) und Ratten (Chu et al., 2006) aus. REN et al. (2003) aber schreiben der Ovariectomie eine negativ inotrope Wirkung zu. Kardiomyozyten von ovariectomierten Ratten kontrahierten signifikant weniger als ihre Kontrollen. CURL et al. (2003) hingegen beobachteten bei Ratten auf Zellverkürzungsebene eine positive Inotropie. Die chronische Substitution ovariectomierter Tiere mit Östrogen veränderte die Kontraktilität der untersuchten Präparate jeweils abhängig vom oben beschriebenen Vorbefund. 17 β -Östradiol-Gabe resultierte in eine positive (REN et al., 2003) oder negative Inotropie (PATTERSON et al., 1998; CURL et al., 2003).

Eine Untersuchung zur Bestimmung des Einflusses des selektiven Östrogenrezeptor-modulators (SERM) Raloxifen am Herzen manifestiert die Bedeutung der ERs für die kardiale Kontraktilität. Die akute Applikation von 1 μ M Raloxifen reduzierte über eine nicht-genomische Wirkungsweise die Zellverkürzung isolierter Ventrikelmyozyten von männlichen Meerschweinchen (LIEW et al., 2004a).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen negativen inotropen Effekten wirkt das Phytohormon Genistein, ein selektiver ER β Agonist, positiv inotrop. LIEW et al. (2003) berichten von einer akuten Zunahme der Zellverkürzung von Meerschweinchen-Kardiomyozyten nach Applikation von 10 und 40 μ M Genistein. Die positive Inotropie tritt unabhängig vom Geschlecht auf, jedoch ausgeprägter in weiblichen als in männlichen Zellen (LIEW et al., 2004b).

Die bisher durchgeführten Untersuchungen an unterschiedlichen Spezies konnten eindeutig zeigen, dass sowohl Östrogen als auch Östrogenrezeptoren eine wichtige Rolle in der Regulation der kardialen Kontraktilität in weiblichen und männlichen Tieren spielen.

Diese Studien erlauben jedoch keine klare Aussage darüber, ob die kardialen Veränderungen Östrogenrezeptor α und/oder β vermittelt sind. Neuere Untersuchungen mittels des ER α -Agonisten ER α -LE2 an ovariectomierten spontan hypertensiven Ratten deuten darauf hin, dass der ER α die kardiale Kontraktilität erhöht (PELZER et al., 2005).

Um die Bedeutung der Östrogenrezeptoren α und β für die kardiale Kontraktilität zu eruieren, untersuchte die vorliegende Arbeit die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten von weiblichen und männlichen ER α - und ER β -defizienten Mäusen. Die ER β -Defizienz wirkte sich weder auf den Phänotyp der Zellen noch auf die kardiale Kontraktilität in beiden Geschlechtern aus (Kapitel 3.1.3). Die Abnahme der Sarkomerverkürzung in weiblichen ER β -defizienten Zellen bei 10 Hz Stimulationsfrequenz ist eher auf einen negativen Einfluss der Zellisolation als auf eine ER β -vermittelte Wirkung zurückzuführen. Die ER α -Defizienz hingegen verminderte die Ruhesarkomerlänge in männlichen Tieren und die Kontraktilität der Kardiomyozyten beiderlei Geschlechts (Kapitel 3.1.4). Des Weiteren wurde eine Abnahme der Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit beobachtet (Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Die Verkürzungsdauer verlängerte sich verstärkt in männlichen ER α -defizienten Mäusen (Abbildung 3.25). Basierend auf den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist erstmalig festzustellen, dass der ER β keinen wesentlichen Einfluss auf die Kontraktilität isolierter muriner Kardiomyozyten ausübt. Der ER α hingegen wirkt positiv inotrop und positiv lusitrop, unabhängig vom Geschlecht.

Eine Abnahme der Kontraktilität reflektiert Veränderungen regulatorischer Proteine, die für die intrazelluläre Calciumhomöostase und myozytäre Kontraktilität zuständig sind. Ein verminderter L-Typ Calciumeinstrom könnte z.B. die kardiale Kontraktilität verringern. Daraus resultierte die im Folgenden diskutierte Untersuchung des L-Typ Calciumstromes.

4.2.2 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf den L-Typ Calciumstrom

Der L-Typ Calciumstrom ($I_{Ca,L}$) übernimmt eine Schlüsselrolle während der elektromechanischen Kopplung von Ventrikelmyozyten (FABIATO, 1985; NÄBAUER et al., 1989; NIGGLI & LEDERER, 1990; CHENG et al., 1996). Während des Aktionspotentials erfolgt ein Ca^{2+} -Influx durch die spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle. Der Calciumeintritt triggert die Calciumfreisetzung aus dem SR. Die Kombination aus Calciumein-

strom und Freisetzung führt zur Ausbildung eines intrazellulären Calciumtransienten. Dies ermöglicht eine Bindung des Calciums an Troponin C und löst die Kontraktion der Sarkomere aus (BERS, 2002). Eine Verminderung des $I_{Ca,L}$ wirkt sich auf den intrazellulären Calciumtransienten und somit auch auf die kardiale Kontraktilität aus.

E2 wird eine calciumantagonistische Wirkung zugeschrieben. Die akute E2-Applikation führt zu einer schnellen, reversiblen und konzentrationsabhängigen Inhibition des $I_{Ca,L}$. Dieser Effekt wurde an Kardiomyozyten von Menschen (MEYER et al., 1998), Meeresschweinchen (JIANG et al., 1992; GROHÉ et al., 1996; LIU et al., 1997; MEYER et al., 1998; NAKAJIMA et al., 1999) und Ratten (BERGER et al., 1997; MEYER et al., 1998) nachgewiesen. Der schnelle Wirkungseintritt und die Reversibilität sprechen für eine nicht-genomische Wirkung. Ein geschlechtsabhängiger Unterschied in der calciumantagonistischen Wirkung konnte nicht gezeigt werden (MEYER et al., 1998).

Hohe E2-Konzentrationen führen also *in vitro* via nicht-genomischer Effekte zu einer Inhibition des $I_{Ca,L}$. Die *in vivo* Gabe von Östrogen, die die genomische Wirkung von Östrogen ermöglicht, hingegen resultiert in eine Erhöhung des $I_{Ca,L}$ (PATTERSON et al., 1998). Erstaunlicherweise wurde dieses Ergebnis von den Autoren als nicht signifikant klassifiziert, obwohl eine Rekalkulation einen signifikanten Unterschied ergab. Dieses Ergebnis wird durch eine Dihydropyridin Bindungsstudie unterstützt (BOWLING et al., 1997). Die orale Gabe von Ethinyl Östradiol steigerte signifikant die L-Typ Calciumkanaldichte im Herzen. In beiden Studien bewirkte eine Verminderung des E2 Serumspiegels mittels Ovariectomie eine leichte, jedoch nicht signifikante Erniedrigung des $I_{Ca,L}$ bzw. der L-Typ Calciumkanaldichte (BOWLING et al., 1997; PATTERSON et al., 1998). Eine neuere Studie hingegen berichtet eine erhöhte Expression der L-Typ- Ca^{2+} α_{1c} -Untereinheit auf Proteinebene nach Ovariectomie (CHU et al., 2006).

Aus den bisherigen Ergebnissen ist eindeutig festzuhalten, dass Östrogene den $I_{Ca,L}$ modifizieren. Die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Studien sind möglicherweise durch unterschiedliche Wirkmechanismen des Östrogens erklärbar. In den *in vivo* Studien kommen neben den nicht-genomischen auch die genomischen Effekte von Östrogen am Herzmuskel zu tragen. Die Resultate der älteren Ovariectomie Studien unterstützen die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass die verminderte Kontraktilität der $ER\alpha$ -defizienten Kardiomyozyten durch einen reduzierten $I_{Ca,L}$ verursacht wird. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde daher erstmalig der genomische Einfluss des ER α auf den $I_{Ca,L}$ anhand der ER α KO Maus von DUPONT et al. (2000) untersucht.

Die ER α -Defizienz verändert weder die Form noch die Lage der Strom-Spannungs-Beziehung in beiden Geschlechtern (Abbildung 3.34). Geschlechtsspezifische Unterschiede traten die maximalen Stromamplituden des $I_{Ca,L,S}$ betreffend auf (Tabelle 3.1). Die ER α -Defizienz verursachte eine signifikante Zunahme der $I_{Ca,L}$ Amplitude in männlichen Kardiomyozyten. In weiblichen ER α -defizienten Zellen veränderte sich der Maximalstrom nicht im Vergleich zur Kontrolle. Weder das Potential der halbmaximalen Aktivierung noch die Steigung der Aktivierungskurve wurden in beiden Geschlechtern durch die ER α -Defizienz verändert (Tabelle 3.1). Das halbmaximale Potential der Inaktivierung wurde durch die ER α Defizienz geschlechtsspezifisch beeinflusst (Tabelle 3.1). In weiblichen Tieren kam es zu einer signifikanten Verschiebung der Inaktivierungskurve in negative Potentialbereiche bei $f_{\infty}=0,5$ um $-1,2$ mV. Konträr dazu verschob sich die Inaktivierungskurve der männlichen ER α -defizienten Kardiomyozyten bei $f_{\infty}=0,5$ um $3,6$ mV nach rechts. Diese Rechtsverschiebung der „Steady State“ Inaktivierung ist jedoch in ihrem Ausmaß zu gering, um die Zunahme des $I_{Ca,L,S}$ allein zu erklären.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen die Ergebnisse von JOHNSON et al. (1997). Diese Autoren zeigten ebenso eine Zunahme der $I_{Ca,L}$ Amplitude in männlichen ER α -defizienten Zellen. Diese Zunahme resultiert aus einer Erhöhung der L-Typ Calciumkanaldichte. Dies wiesen JOHNSON et al. (1997) mittels einer Dihydropyridin Bindungsstudie nach. Diese Experimente wurden jedoch an einer anderen ER α KO Mauslinie durchgeführt. Bei dieser von LUBAHN et al. (1993) generierten Knockout Maus handelt es sich nicht um eine Nullmutante. Sie besitzt eine transkriptionell aktive Form von ER α (COUSE et al., 1995). Ein ER α vermittelter Effekt war also vorab nicht auszuschließen. Des Weiteren verwendet diese Arbeitsgruppe eine heterogene Kontrollgruppe bestehend aus ER α $+/+$ Mäuse und C57BL/6 Tieren. Die vorliegende Arbeit erweitert die von JOHNSON et al. (1997) durchgeführte Untersuchung noch um die weibliche Population.

Der in der vorliegende Studie erhöhte $I_{Ca,L}$ in männlichen ER α -defizienten Kardiomyozyten ist aufgrund der Befunde von JOHNSON et al. (1997) möglicherweise auf eine erhöhte L-Typ Calciumkanal Expression zurückzuführen. Eine in dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Diplomarbeit, konnte jedoch keine erhöhte Expression der L-Typ-Ca²⁺ α_{1c} -

Untereinheit auf Proteinebene feststellen (FAROWSKI, 2004). Die divergenten Ergebnisse resultieren laut FAROWSKI (2004) aus den unterschiedlichen verwendeten Methoden. Dihydropyridine binden nicht nur an L-Typ Ca^{2+} -Kanälen mit α_{1c} -Untereinheit sondern auch an den zweiten im Herzen vorkommenden L-Typ Kanaltyp mit einer α_{1D} -Untereinheit (BERS, 2001). Daher sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus der Zunahme des $I_{\text{Ca,L}}$ zu erklären.

Abschließend ist festzuhalten, dass weder ein unveränderter noch ein erhöhter $I_{\text{Ca,L}}$ die verminderte Kontraktilität der $\text{ER}\alpha$ -defizienten Zellen erklären. Die oben aufgestellte Hypothese muss daher verworfen werden.

4.2.3 Einfluss der Östrogenrezeptoren α und β auf die SERCA 2a und Phospholamban Expression

Die Proteine des SRs, verantwortlich für den Calciumtransport, sind wichtige Regulatoren für die kardiale Kontraktilität. Die Aktivität der SERCA 2a beeinflusst ausschlaggebend die Kontraktilität (MEYER et al., 1999). Die SERCA 2a wird durch das inhibitorische Protein Phospholamban reguliert (KOSS & KRANIAS, 1996). Im unphosphorylierten Zustand inhibiert PLB die SERCA 2a Aktivität. Diese Inhibition kann durch vier Mechanismen aufgehoben werden: 1. durch eine Protein-Kinase A oder 2. durch eine Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase vermittelte Phosphorylierung von PLB, 3. durch eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und 4. durch eine Verminderung der PLB Expression. Somit wirkt sich auch eine Veränderung der Proteinexpressionen von SERCA 2a und PLB auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten aus. Eine PLB Überexpression vermindert die Kontraktilität während eine SERCA 2a Überexpression diese leicht erhöht (MEYER et al., 1999). Ausschlaggebend für die Regulation der Kontraktilität ist das Verhältnis dieser beiden Proteine. Eine Zunahme des PLB/SERCA 2a Verhältnis vermindert die Calciumaffinität der SERCA 2a und führt somit zu einer verminderten Kontraktilität. Eine Erniedrigung des Verhältnisses erhöht die Pumprate der SERCA 2a resultierend in einer Zunahme der Kontraktion (MEYER et al., 1999). Basierend auf diesen Theorien könnte also eine Zunahme des PLB/SERCA 2a Verhältnisses/Abnahme des SERCA 2a/PLB Verhältnisses bzw. eine verminderte Expression dieser beiden Proteine die verminderte Kontraktilität der $\text{ER}\alpha$ -defizienten Zellen erklären. Eine unveränderte PLB und SERCA 2a Expression in den $\text{ER}\beta$ -defizienten Zellen würde den nicht vorhandenen Einfluss des $\text{ER}\beta$ auf die Kontraktilität unterstreichen.

Bisherige Ergebnisse von Untersuchungen an ovariectomierten Ratten sind widersprüchlich. Die Östrogendefizienz resultierte entweder in einer unveränderten SERCA 2a und PLB Expression (CHU et al., 2006), einer reduzierten SERCA 2a und einer unveränderten PLB Expression (BUPHA-INTR & WATTANAPERMPPOOL, 2006) oder in einer geringfügig veränderten SERCA 2a und PLB Expression (REN et al., 2003). Das SERCA 2a/PLB Verhältnis war jedoch in den beiden zuletzt genannten Studien signifikant vermindert (REN et al., 2003; BUPHA-INTR & WATTANAPERMPPOOL, 2006), einhergehend mit einer reduzierten Kontraktilität (REN et al., 2003). BUPHA-INTR & WATTANAPERMPPOOL (2006) zeigten ergänzend, dass die maximale SR Ca^{2+} Aufnahmeaktivität in Herzen nach Ovariectomie vermindert ist. Diese Befunde unterstützen die zuvor aufgestellte Hypothese.

Die SERCA 2a und PLB Expressionsdaten der ER α - und ER β -defizienten Tiere und deren Kontrollen wurden in Kooperation mit einem Diplomanden der Arbeitsgruppe (FAROWSKI, 2004) erhoben. Die Western-Blot Untersuchungen von ER α Tieren ergaben geschlechtsspezifisch unterschiedliche Expressionsmuster von SERCA 2a und PLB. In weiblichen ER α -defizienten Herzen waren die SERCA 2a und PLB Expressionen nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrolle. In männlichen ER α KOs konnte ein signifikanter Rückgang der SERCA 2a und PLB Expression nachgewiesen werden. Das SERCA 2a/PLB Verhältnis war um 19% verringert (FAROWSKI, 2004). Die „Post Rest“ Kontraktion, als Maß für die Fähigkeit des SRs Ca^{2+} zu speichern und freizusetzen (BERS, 2001), zeigte eine nur geringfügige Abnahme der Verkürzungsamplitude in den weiblichen ER α -defizienten Zellen, aber eine signifikante Abnahme in männlichen ER α -defizienten Kardiomyozyten (Abbildung 3.30).

Diese Befunde deuten auf eine geschlechtsspezifische Regulation der SERCA 2a und PLB Expression hin. In weiblichen Tieren erfolgt die Expression dieser beiden Proteine entweder ER α KO unabhängig oder die Expression von SERCA 2a und PLB wird kompensatorisch über eine ER β vermittelte Regulation aufrechterhalten. Die unveränderten Expressionsmuster der an der Calciumhomöostase beteiligten Proteine liefern keine Erklärung für die verminderte Kontraktilität der weiblichen ER α -defizienten Zellen. Die Befunde der männlichen Expressionsmuster und „Post Rest“ Verkürzungsmessung hingegen lassen einen verminderten systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in männlichen ER α -defizienten Kardiomyozyten vermuten. Dieser wiederum bedingt die verminderte Kontraktilität.

Des Weiteren können diese Ergebnisse zur Erklärung des erhöhten L-Typ Calciumstromes der männlichen ER α -defizienten Zellen herangezogen werden. Die Inaktivierung des L-Typ Calciumkanals erfolgt sowohl zeit-, spannungs- als auch calciumabhängig (KASS & SANGUINETTI, 1984; LEE et al., 1985; HADLEY & HUME, 1987), letzteres in Form eines negativen Feedbacks. Zur Inhibition tragen sowohl das durch den L-Typ Calciumkanal eingetretene Calcium als auch das aus dem SR freigesetzte Calcium bei (BERS, 2000). Eine vermehrte Calciumfreisetzung aus dem SR führt zu einer beschleunigten Inaktivierung des $I_{Ca,L,S}$ (SIPIDO et al., 1995). Ebenso führt eine verminderte Ca^{2+} -Freisetzung zu einer verzögerten Inaktivierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals und damit zu einem vermehrten Ca^{2+} -Influx (BERS, 2002). Die Zunahme der $I_{Ca,L}$ Amplitude in männlichen ER α -defizienten Zellen könnte also möglicherweise aus einer verminderten SR Ca^{2+} -Freisetzung verbunden mit einer verzögerten $I_{Ca,L}$ Inaktivierung resultieren.

Die erhobenen SERCA 2a und PLB Expressionsmuster der ER β defizienten Tiere und Kontrollen beiderlei Geschlechts unterstützen die Annahme, dass dem ER β keine bedeutende Rolle bei der elektromechanischen Kopplung zu zuschreiben ist. Die Expressionsmuster der weiblichen (FAROWSKI, 2004) und männlichen (Abbildung 3.42 und Abbildung 3.43) ER β -defizienten Tiere waren nahezu unverändert.

4.2.4 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die Kv 4.3 und Kv 1.5 Kanal-Expression

Die in Myozyten exprimierten Kaliumkanäle sind sehr unterschiedlich. Strukturell können sie jedoch in zwei Klassen gegliedert werden: (1) spannungsabhängige Kaliumkanäle und (2) Einwärtsgleichrichter. Alle produzieren einen Auswärtsstrom im physiologischen Membranpotentialbereich und tragen damit maßgeblich zur Repolarisation des Aktionspotentials bei (FISSET et al., 1997; BERS, 2001). Vor allem die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle kontrollieren hauptsächlich die Amplitude und die Dauer des Aktionspotentials (APD). Basierend auf Unterschieden in den zeit- und spannungsabhängigen Parametern, werden die Ströme durch diese Kanäle nochmals in zwei Untergruppen unterteilt: (1) schnell aktivierende und inaktivierende transiente K^+ -Auswärtsströme (I_{to}), zuständig für die erste Repolarisationsphase des APs und (2) die verzögerten Auswärtsgleichrichterströme (I_K), beteiligt an der späteren Phase der Repolarisation (BARRY & NERBONNE, 1996; NERBONNE, 1998; SNYDERS, 1999). Im Maus-Herz gibt es vier relevante spannungsabhängige K^+ -Ströme auf Ventrikel Ebene:

$I_{to,fast}$ (f), $I_{to,slow}$ (s), $I_{K,slow}$ (I_{Kur} = 4-Aminopyridin sensitive Komponente des $I_{K,slow}$; TRÉPANIÉ-BOULAY et al., 2001) und I_{ss} (XU et al., 1999a). Der $I_{to,f}$ übernimmt die Hauptaufgabe bei der Repolarisation (BARRY et al., 1998; SANGUINETTI, 2002). Die zu $I_{to,f}$ gehörenden Kandidatengene sind Kv 4.2 und/oder Kv 4.3, $I_{to,s}$ wird von Kv 1.4 und I_{Kur} von Kv 1.5 codiert (XU et al., 1999b; GUO et al., 1999; BERS, 2001). Es ist bekannt, dass in der Expression von Kaliumkanälen ebenso wie im Auftreten von Kaliumströmen große Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies bestehen (WETTWER et al., 1993; BARRY & NERBONNE, 1996; PRIEBE & BEUCKELMANN, 1998; WANG et al., 1999), aber auch in den Herzen der Individuen einer Spezies variiert die Kaliumkanalexpression lokal (BARRY & NERBONNE, 1996; XU et al., 1999a). $I_{to,f}$, $I_{K,slow}$ und I_{ss} kommen sowohl in den Zellen der linken Ventrikelspitze als auch im Septum vor, $I_{to,s}$ nur im linksventrikulären Septum (XU et al., 1999a). Zusätzlich wurden bei CD-1 Mäusen geschlechtsspezifische Unterschiede in der K^+ -Kanalexpression beobachtet. Sowohl die Kv 1.5 Kanalexpression (TRÉPANIÉ-BOULAY et al., 2001) als auch der dazugehörige Strom I_{Kur} waren in weiblichen Kardiomyozyten signifikant vermindert (TRÉPANIÉ-BOULAY et al., 2001; BROUILLETTE et al., 2005). Expressionsunterschiede manifestieren sich in entsprechenden Veränderungen der Aktionspotentialform. I_{to} und I_{Kur} Reduktion führen zur Verlängerung der Aktionspotentialdauer (GUO et al., 1999; XU et al., 1999b; WICKENDEN et al., 1999; NERBONNE, 2000; TRÉPANIÉ-BOULAY et al., 2001; SAH et al., 2002; ZOBEL et al., 2002). Frühere Untersuchungen an Tieren liefern Hinweise, dass sowohl die K^+ -Kanalexpression als auch die K^+ -Ströme durch Östrogen reguliert werden. Die akute Applikation von $30\mu\text{M}$ 17β -Östradiol führte in männlichen Ratten-Kardiomyozyten zu einer Reduktion der $I_{to,f}$ und $I_{to,s}$ Stromamplituden (BERGER et al., 1997). Dieselbe Intervention verminderte I_{Kr} und I_{Ks} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten (NAKAJIMA et al., 1999; TANABE et al., 1999). E2 regulierte die HK2 Kanalexpression in Kardiomyozyten von ovariectomierten Ratten herunter (DRICI et al., 1996). Des Weiteren ist Östrogen ein wichtiger transkriptioneller Faktor, der die Herunterregulation der Kv 4.3 Kanalexpression am Ende der Schwangerschaft kontrolliert (SONG et al., 2001).

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmalig, dass ER α die Transkription von Kv 4.3 und Kv 1.5 reguliert (Abbildung 3.44 und Abbildung 3.45). Die Regulation erfolgt geschlechtsspezifisch. In männlichen linksventrikulären Zellen führt die ER α -Defizienz zu einer Hochregulation der Kv 4.3 Kanalexpression um das 1,4-fache, aber gleichzeitig

auch zu einer Herunterregulation der Kv 1.5 Kanalexpression um das 3,7-fache. Im Gegensatz dazu wird die Kv 4.3 und Kv 1.5 Kanalexpression in weiblichen Zellen geringfügig durch ER α vermindert. Die Western-Blot Analysen weiblicher und männlicher ER β Zellen (FAROWSKI, 2004) weisen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen ER β und der Kv 4.3 Kanalexpression nach.

Der von TRÉPANIÉ-BOULAYET et al. (2001) bei CD-1 Mäusen beschriebene geschlechtsspezifische Unterschied in der Kv 1.5 Kanalexpression konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Der Kv 1.5 wird in männlichen WT Ventrikelzellen 2,5-fach höher exprimiert als in weiblichen WT Zellen. Konträr zu der oben erwähnten Studie entdeckte die vorliegende Arbeit eine 1,75-fach erhöhte Kv 4.3 Kanalexpression auf Proteinebene in weiblichen WT Zellen im Vergleich zu männlichen WT Zellen. TRÉPANIÉ-BOULAYET et al. (2001) zeigten nahezu gleiche Kv 4.3 mRNA Level. Diese Differenz deutet möglicherweise auf eine ER α vermittelte posttranskriptionelle Regulation hin. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre auch ein von der Mauslinie abhängiger Unterschied. In weiblichen C57BL/6 Zellen ist die Kv 4.3. Expression nur 1,2-fach erhöht im Vergleich zu männlichen Zellen (Daten nicht gezeigt). BROUILLETTE et al. (2005) zeigten ebenso einen Einfluss der Mauslinie bzw. der daraus resultierenden unterschiedlichen Testosteronspiegel auf den I_{Kur} .

In wieweit sich die veränderten Kanalexpressionen auf die K^+ -Stromamplituden auswirken, bleibt zu überprüfen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass in männlichen ER α -defizienten Tieren der I_{to} erhöht und der I_{Kur} vermindert ist. In weiblichen Tieren resultiert die ER α -Defizienz möglicherweise in einer geringfügigen Abnahme der I_{Kur} und I_{to} Stromamplitude. Die im Folgenden diskutierten Aktionspotentiale deuten auf eine mögliche Veränderung hin und tragen damit zur Erklärung der verminderten Kontraktilität der ER α -defizienten Zellen bei.

4.2.5 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die Aktionspotentialform

Das Aktionspotential ist der initiale Mechanismus der elektromechanischen Kopplung. Es ist eine Membranpotentialänderung, die durch ein komplexes Zusammenspiel von Ionenkanälen, Transportern und dem Calciumtransienten entsteht. Gleichzeitig beeinflusst das Aktionspotential Ionenkanäle und Transporter und löst den Calciumtransienten aus (BERS, 2001). Das Aktionspotential der Maus ist relativ kurz und besitzt eine nahezu

dreieckige Form (BERS, 2001; Abbildung 3.37). Die Aktionspotentialdauer (APD) scheint mit der Herzgröße oder Herzfrequenz korreliert zu sein, da schneller schlagende Herzen eine kürzere APD besitzen als langsam schlagende Herzen (BONDARENKO et al., 2004).

Der $I_{Ca,L}$ stellt einen depolarisierenden Einwärtsstrom während des APs dar. Er trägt jedoch nicht zum schnellen Aufstrich des Aktionspotentials bei. An der AP Spitze gleichen sich die Einwärtsströme ($I_{Na} + I_{Ca}$) und Auswärtsströme aus (I_K). In der frühen Repolarisationsphase findet u.a. die calciumabhängige Inaktivierung des $I_{Ca,L}$ s statt. Die Dauer und Amplitude des Aktionspotentials kardialer Zellen wird vor allem durch spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle bestimmt. Die schnelle Repolarisation des Maus APs ist wesentlich durch den Kaliumstrom I_{to} bedingt. Auch Veränderungen des $I_{Ca,L}$ und des Calciumtransienten können jedoch die Aktionspotentialform beeinflussen. Andererseits bestimmt die AP-Form wieder den Calciumtransienten mit (SAH et al., 2001) und kontrolliert so auch die Kontraktilität der Zellen.

Schon frühere Experimente zeigten einen Zusammenhang zwischen nicht-genomischen Wirkungen von Östrogen, veränderten Ionenströmen und daraus resultierenden Aktionspotentialformänderungen auf. Die akute Applikation von 17β -Östradiol verlängerte die APD in männlichen Ratten-Kardiomyozyten und weiblichen Meerschweinchen-Kardiomyozyten. Die Autoren erklären dies mit einem verminderten $I_{to,f}$, $I_{to,s}$ (Ratten) bzw. einem verringerten I_{Kr} , I_{Ks} (Meerschweinchen) bei reduziertem $I_{Ca,L}$ Strom in beiden Spezies (BERGER et al., 1997; TANABE et al., 1999). NAKAJIMA et al. (1999) berichten jedoch von einer Östrogen vermittelten Aktionspotentialverkürzung resultierend aus einer Inhibition des $I_{Ca,L}$ s bei weiblichen Meerschweinchen-Kardiomyozyten, entnommen aus dem Atrium. Raloxifene führte ebenfalls zu einer verkürzten APD, basierend auf einem verminderten $I_{Ca,L}$ (LIEW et al., 2004b). Die Ergebnisse der Applikationsstudien geben jedoch keinen Hinweis darauf, ob diese Veränderungen $ER\alpha$ vermittelt sind.

Erste Ergebnisse hierzu lieferten JOHNSON et al. (1999). Die $ER\alpha$ -Defizienz erhöhte die $I_{Ca,L}$ Amplitude in männlichen Kardiomyozyten. Dies spiegelte sich in einer verlängerten APD in der von dieser Arbeitsgruppe verwendeten Mutante wieder.

Die Daten der vorliegende Untersuchung bestätigen nicht die Resultate von JOHNSON et al. (1999). Sondern die $ER\alpha$ -Defizienz verkürzte tendenziell die APD_{90} in weiblichen und männlichen Zellen, ausgeprägter in männlichen Tieren (Abbildung 3.39.) Diese

Verkürzung der APD_{90} gilt es jedoch zu verifizieren, da nur eine signifikante APD_{90} Verkürzung bei 2 Hz Stimulationsfrequenz in der männlichen Gruppe vorliegt. Sehr wahrscheinlich verhinderten die hohen Standardabweichungen der Mittelwerte die Signifikanz. Bei der angewandten Methode der Zellisolierung wurden Zellen aus allen Teilen des Herzens vermischt. Dies führt zur Zusammenfassung aller AP-Formen in einer Gruppe und damit zur Verwischung eventuell vorhandener Unterschiede. Die Aktionspotentiale von Septumzellen sind signifikant länger als Aktionspotentiale von Zellen des Apex und midmyokardiale APs sind länger als endo- und diese wiederum als epikardiale APs (GUO et al., 1999; NERBONNE, 2000; DILLY et al., 2006). Die transmuralen Unterschiede sind dazu noch in weiblichen Präparaten stärker ausgeprägt als in männlichen (PHAM et al., 2001). Die hier dargestellten AP Messungen wurden an links- und rechtsventrikulären Zellen durchgeführt. Messungen nur an Apex Zellen könnten die hier beobachtete APD_{90} Verkürzung bestätigen. Die APD_{50} ist in weiblichen $ER\alpha$ -defizienten Zellen ebenso tendenziell in fast allen Frequenzbereichen verringert, in männlichen $ER\alpha$ -defizienten Zellen hingegen ist sie den meisten Frequenzbereichen erhöht (Abbildung 3.38).

Aktionspotentialveränderungen wirken sich auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten aus. AP-clamp Untersuchungen bestätigten einen direkten positiven Zusammenhang zwischen Aktionspotentialform, $I_{Ca,L}$ und $[Ca^{2+}]_i$ (LINZ & MEYER, 1998; KAPRIELIAN et al., 1999). Eine AP Verlängerung geht daher mit einer positiven Inotropie einher (BOUCHARD et al., 1995). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine AP Verkürzung von einer negativen Inotropie begleitet wird. Die beobachtete Kontraktilitätsverminderung der weiblichen und männlichen $ER\alpha$ -defizienten Zellen basiert sehr wahrscheinlich auf einer APD_{90} Verkürzung. Diese führt zu einem relativ verminderten Ca^{2+} -Influx, der wiederum die Ca^{2+} Beladung des SRs herabsetzt. In der Verlängerung der APD_{50} in den männlichen $ER\alpha$ -defizienten Zellen ist der im Vergleich zum WT möglicherweise kompensatorisch erhöhte $I_{Ca,L}$ (Kapitel 4.2.2) zu erkennen. Die verkürzte APD_{90} stützt jedoch die Annahme einer verminderten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Darüber hinaus zeigt diese Verkürzung der AP an, dass vermutlich eine $ER\alpha$ vermittelte Zunahme der an der Repolarisation beteiligten K^+ -Ströme vorliegt. In männlichen $ER\alpha$ KOs konnte dies für den $I_{to,f}$ auf molekularer Ebene bewiesen werden (Kapitel 4.2.4). Eine Veränderung des $I_{to,f}$ s wirkt sich auf die Calciumhomöostase und die Kontraktilität aus. Eine AP Verlängerung aufgrund

einer I_{to} Reduktion in Herzen von Nagetieren lässt den intrazellulären Calciumtransienten mittels eines erhöhten L-Typ Ca^{2+} -Influx ansteigen (BOUCHARD et al., 1995; WICKENDEN et al., 1998; KAPRIELIAN et al., 1999; SAH et al., 2001; SAH et al., 2002). Eine Zunahme des I_{to} würde somit den L-Typ Ca^{2+} -Influx und $[Ca^{2+}]_i$ reduzieren. Ein Beitrag des I_{to} zur Reduktion des $[Ca^{2+}]_i$ in männlichen ER α KO ist zu vermuten, trotz des erhöhten L-Typ Ca^{2+} -Stromes in diesen Zellen (Kapitel 4.2.2). Dies könnte die verminderte Kontraktilität der männlichen ER α KOs mit erklären.

4.2.5.1 Die Frequenzabhängigkeit der APD₉₀

Eine frequenzabhängige Abnahme der APD ist von den meisten Säugetieren bekannt (WILLIAMS et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch erstmalig die frequenzabhängige Zunahme der APD₉₀ an Maus-Kardiomyozyten gezeigt. Die APD₉₀ verlängerte sich signifikant bei 8 und 10 Hz im Vergleich zu 0,5 Hz Stimulationsfrequenz (Abbildung 3.41). Ein ähnliches Verhalten zeigen Hamster- und Ratten-Kardiomyozyten (BERGER et al., 1997; KOCIC et al., 2001). Die frequenzabhängige APD Zunahme trifft sowohl für endo- als auch epikardiale Zellen zu (KOCIC et al., 2001). Die Repolarisation des APs ist gekennzeichnet durch sich überlappende Ein- und Auswärtsströme. Die zeitabhängigen Eigenschaften und die Inaktivierungskinetik dieser Ströme bestimmen das frequenzabhängige Verhalten der APs. Die frequenzabhängige Zunahme der APD in Hamster- und Ratten-Kardiomyozyten basiert auf der langsamen Erholung des $I_{to,f}$ (Hamster) bzw. $I_{to,s}$ (Ratte) von der Inaktivierung (Berger et al., 1997; KOCIC et al., 2001). Aufgrund der langsamen Erholungskinetik von der „Steady State“ Inaktivierung ist der $I_{to,s}$ in Maus-Kardiomyozyten möglicherweise zuständig für die beobachtete frequenzabhängige Zunahme der APD (GUO et al., 1999). Die Autoren meinen, dass dieser Strom bei physiologischer Herzfrequenz der Maus nahezu inaktiviert ist. Die Zuständigkeit des $I_{to,s}$ als alleiniger Verursacher der APD Zunahme ließe sich mit Messung von APs von rechtsventrikulären Zellen eruieren. In diesen Zellen ist der $I_{to,s}$ nicht vorhanden (NERBONNE, 2000). Somit dürfte eine frequenzabhängige Zunahme der APD in rechtsventrikulären Kardiomyozyten nicht nachweisbar sein.

4.2.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der elektromechanischen Kopplung der ER α -defizienten Mäuse

Aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist zu schließen, dass der ER α eine wichtige Rolle für das Ausmaß der Kontraktilität sowohl in weiblichen als auch männlichen Tieren spielt. Das Fehlen des ER α resultiert in beiden Geschlechtern in eine Kontraktionsverminderung auf Ebene der isolierten Kardiomyozyten. Es handelt sich um einen genomischen Einfluss, der jedoch geschlechtsabhängig unterschiedlich vermittelt wird.

In männlichen Tieren beeinflusst der ER α die SERCA 2a und PLB Expression. Der Rückgang der SERCA 2a und PLB Expression einhergehend mit einem verminderten SERCA 2a/PLB Verhältnis in männlichen ER α -defizienten Tieren (Kapitel 4.2.3; FAROWSKI, 2004) könnte möglicherweise die Kontraktionsverminderung bei diesen Tieren erklären. Andererseits kann es sich auch um einen Kompensationsmechanismus für den vergrößerten $I_{Ca,L}$ handeln. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kv 4.3 und Kv 1.5 Kanalexpression durch den ER α reguliert wird. Die Kv 4.3 Expression ist in ER α -defizienten Zellen vermindert, die Kv 1.5 Expression ist hingegen erhöht. In wie weit der vermutlich erhöhte $I_{to,f}$ zur beschleunigten Repolarisation und damit auch zur verminderten Kontraktilität beiträgt (Kapitel 4.2.4), bleibt zu überprüfen.

Der verminderten Kontraktilität in weiblichen ER α -defizienten Tieren liegen andere Mechanismen zu Grunde. Weder die calciumregulatorischen Proteine SERCA 2a, PLB, Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (FAROWSKI, 2004) und L-Typ Ca²⁺-Kanal, noch die Kv 4.3 und Kv 1.5 Kanalexpression werden durch den ER α modifiziert. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine reduzierte CICF. Ein gleich bleibender Calciumstrom würde somit zu einer verminderten Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR führen. Eine weitere Hypothese wäre eine Akt vermittelte Reduktion der Kontraktilität der ER α -defizienten Zellen. Bei Akt handelt es sich um eine Serin/Threonin Proteinkinase, die in vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt und unter anderem auch durch Östrogen via ER α aktiviert wird (PATTEN & KARAS, 2006). Akt beeinflusst viele verschiedene zelluläre Funktionen von Kardiomyozyten wie das Wachstum und Überleben (MATSUI et al., 2003; HEINKE & MOLKENTIN, 2006) der Zellen als auch die Kontraktilität (KIM et al., 2003; ROTA et al., 2005; CITTADINI et al., 2006). Die relative Akt Phosphorylierung im Nucleus war in den weiblichen ER α KOs vermindert im Vergleich zu den WT Tieren, in männlichen

ER α KOs wurden keine Veränderung beobachtet (FAROWSKI, 2004). Drei Arbeitsgruppen zeigten einen positiven Zusammenhang zwischen Akt und Kontraktilität in hypertrophierten (KIM et al., 2003) und normalen Kardiomyozyten (ROTA et al., 2005; CITTADINI et al., 2006) auf. Eine Überexpression von Akt in Maus-Kardiomyozyten erhöhte die Kontraktilität durch eine veränderte Calciumprozessierung und eine veränderte Ca²⁺ Sensitivität der Myofilamente. Somit könnte die verminderte relative Akt Phosphorylierung eine Erklärung für die beobachtete reduzierte Kontraktilität der weiblichen ER α -defizienten Zellen sein.

4.3 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf den kardialen Phänotyp

4.3.1 Einfluss des Östrogenrezeptors α auf morphologische Parameter

In adulten weiblichen WT Mäusen waren das Körpergewicht (KG), Herzgewicht (HG), linksventrikuläre Gewicht (LVG) und rechtsventrikuläre Gewicht (RVG) signifikant niedriger als in männlichen WT Tieren gleichen Alters. Die Längen der Tibia (TL) unterschieden sich nicht (Tabelle 3.2). Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten einer Studie, die die alters- und geschlechtsabhängige Veränderungen der kardiovaskulären Parametern an C57BL/6 Mäusen untersuchte und in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe erfolgte, nahezu überein (TIEMANN et al., 2003). Die Parameter LVG/KG als auch LVG/TL spiegeln die oben beschriebenen Unterschiede wieder. Beide Verhältnisse waren in weiblichen WT Tieren signifikant erniedrigt (Tabelle 3.2). Um eine Aussage über Veränderungen des Herzgewichtes zu treffen, ist das Verhältnis LVG/TL präziser als LVG/KG, da so geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entwicklung des KGs eliminiert werden. Die Tibia hingegen entwickelt sich bei beiden Geschlechtern gleich und verlängert sich nach dem 70. Postnataltag kaum (TIEMANN et al., 2003). Die vorliegende Studie beobachtet also geschlechtsabhängige Unterschiede die morphologischen Parameter betreffend.

Bisherige tierexperimentelle Studien deckten einen Zusammenhang zwischen Östrogen und KG Entwicklung auf. Östrogenentzug durch Ovariectomie führte zu einer signifikanten KG Zunahme in weiblichen Ratten (SCHAIBLE et al., 1984; SCHEUER et al., 1987; BOWLING et al., 1997; HINTZ et al., 2001; REN et al., 2003; THAWORNKAIWONG et al., 2007; ARIAS-LOZA et al., 2007). Diese Veränderung konnte bei einer zusätzlichen E2

Substitution nicht beobachtet werden (SCHEUER et al., 1987; BOWLING et al., 1997; REN et al., 2003). In fast allen Studien wurde keine Beeinflussung des HGs durch die Östrogendefizienz beschrieben. Nur SCHAIBLE et al. (1984) und THAWORNKAIWONG et al. (2007) verzeichneten eine Herzgewichtszunahme.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ER α -Defizienz die morphologischen Parameter in weiblichen und männlichen Mäusen gleichen Alters konträr beeinflusst (Tabelle 3.2). Das Fehlen des ER α führte bei Weibchen zu einer signifikanten KG-, LVG- und RVG-Zunahme. Die ER α -Defizienz veränderte das TL-Wachstum nicht, so dass sich das Verhältnis LVG/TL in weiblichen Tieren signifikant erhöhte. In männlichen ER α KOs hingegen veränderte sich das KG kaum, aber das LVG und auch das HG nahmen ab. Dies reduzierte das Verhältnis LVG/TL geringfügig. Interessanterweise hebt die ER α -Defizienz die geschlechtsabhängigen Unterschiede der morphologischen Parameter betreffend auf. Die Erhöhung des KGs in weiblichen ER α -defizienten Tieren ist möglicherweise auf Konzentrationsveränderungen des Hormons Leptin im Serum zurückzuführen (CHU et al., 1999). Die Reduzierung des HGs in männlichen ER α -defizienten Tieren resultiert teilweise aus der verminderten Größe der Kardiomyozyten dieser Tiere, die in Rahmen der elektrophysiologischen Messungen in Form einer reduzierten Zellkapazität ermittelt wurde.

Im Gegensatz zu dieser Studie beobachteten JOHNSON et al. (1997) keine Veränderungen des Herzgewichtes und der Größe der Membranoberfläche (berechnet aus der Zellkapazität) in männlichen ER α KOs. Auch die Untersuchungen von SKAVDAHL et al. (2005) ergaben keine Differenzen im HG/KG Verhältnis zwischen weiblichen ER α KO und WT Tieren. Sowohl JOHNSON et al. (1997) als auch SKAVDAHL et al. (2005) verwendeten in ihren Experimenten die von LUBAHN et al. (1993) generierte ER α KO Maus. Der nicht vollständige Knockout des ER α könnte also die zu der hier vorliegenden Studie unterschiedlichen Ergebnisse verursachen. Zusätzlich arbeitete die Gruppe von SKAVDAHL et al. (2005) mit 64 Tage alten Tieren. In weiblichen Tieren ist eine progressive Gewichtszunahme mit steigendem Alter zu verzeichnen (TIEMANN et al., 2003), so dass ein altersabhängiger Unterschied nicht auszuschließen ist.

4.3.2 Auswirkungen des Östrogenrezeptor α auf das Elektrokardiogramm

Eine geschlechtsabhängige Ausprägung des QT-Intervalls ist sowohl beim Mensch als auch bei Tieren bekannt (BAZETT, 1920; MERRI et al., 1989; RAUTAHARJU et al., 1992; BURKE et al., 1997; STRAMBA-BADIALE et al., 1997; CHENG, 2006). Mädchen und Jungen haben gleiche QT-Intervalle. Mit Einsetzen der Pubertät verkürzt sich das QT-Intervall im männlichen Geschlecht. Bei den Frauen bleibt es gleich (LEVINSON et al., 1985; RAUTAHARJU et al., 1992). Der Zeitpunkt der Veränderungen deutet darauf hin, dass Geschlechtshormone an diesem Vorgang beteiligt sind. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Bei männlichen Mäusen verlängerte sich das QT_c-Intervall nach einer Kastration, was auf eine mögliche Beteiligung der Androgene an der kardialen Repolarisation hinweist (BROUILLETTE et al., 2003). Ovariectomie hingegen beeinflusste das QT-Intervall nicht (SABA et al., 2002). Ob eine ER α -Defizienz die elektrophysiologischen Parameter verändert, ist noch nicht eindeutig verifiziert. JOHNSON et al. (1997) beschreiben bei männlichen ER α KOs eine QT- und QT_c-Intervall Verlängerung. Die ER α -Defizienz veränderte andere elektrophysiologische Parameter wie PQ-Intervall und QRS-Komplex nicht signifikant. In der hier vorliegenden Studie wurde konträr zu JOHNSON et al. (1997) eine tendenzielle Verkürzung der APD₉₀ in den weiblichen und männlichen ER α KO Tieren beobachtet (Kapitel 4.2.5). Die aufgrund der Einzelzelluntersuchungen vermutete verkürzte Repolarisation konnte nur in weiblichen ER α KOs bestätigt werden. Die ER α -Defizienz verkürzte das QT- und QT_c-Intervall weiblicher Tiere auf die Werte männlicher WT und ER α KOs. PR-Intervall, QRS-Komplex und die Herzfrequenz wurden nicht beeinflusst (Tabelle 3.3). Basierend auf den Untersuchungsergebnissen dieser Studie ist anzunehmen, dass der ER α die geschlechtsspezifischen Unterschiede im QT-Intervall vermittelt. Die von JOHNSON et al. (1997) beschriebenen Ergebnisse sind kritisch zu betrachten, da diese Arbeitsgruppe einerseits, wie vorher schon erwähnt, eine unvollständige Mutante untersuchte und andererseits bei der Auswertung des QT-Intervalls möglicherweise das biphasische Verhalten der T-Welle nicht berücksichtigt hat. Im Rahmen einer Myokard Infarkt Studie untersuchten KORTE et al. (2005) auch das Elektrokardiogramm von schein-operierten weiblichen ER α KO und schein-operierten WT Tieren der hier verwendeten Mauslinie. Mittels eines Telemetrie-Verfahrens konnten die Autoren die vorliegenden Resultate nicht bestätigen.

Weder das QT- noch das QT_c-Intervall unterschieden sich signifikant. Hier bleibt zu überprüfen, welchen Einfluss die Schein-Op auf die gemessenen Parameter ausübte.

4.3.3 Einfluss des Östrogenrezeptors α auf die Hämodynamik

Im Bereich des peripheren Blutdrucks traten in den zu vergleichenden Gruppen sowohl geschlechtsabhängige als auch ER α vermittelte Unterschiede auf. Der systolische (Abbildung 3.48), diastolische (Abbildung 3.49) und mittlere arterielle Blutdruck (Abbildung 3.50) waren in den männlichen Kontrolltieren signifikant höher als in männlichen ER α KO und weiblichen WT Tieren. Die Blutdruckwerte der beiden weiblichen Untersuchungsgruppen unterschieden sich kaum voneinander. Die ER α -Defizienz hob wieder die geschlechtsabhängigen Unterschiede auf, weibliche und männliche ER α KOs entwickelten nahezu gleiche periphere Drücke.

Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten geschlechtsabhängigen Blutdruckunterschiede wurden in der von TIEMANN et al. (2003) durchgeführten Studie an C57BL/6 Mäusen nicht beobachtet. Die dort gemessenen Blutdruckwerte liegen über den hier beschriebenen. Ursächlich dafür sind Unterschiede in der Mauslinie, unterschiedliche Narkosetiefe und verwendete Katheter. Die hier gemessenen Blutdruckwerte der ER α KO und WT Tiere bewegen sich im physiologischen Bereich (DOEVENDANS et al., 1998). Die in der vorliegenden Studie erhobenen geschlechtsabhängigen Unterschiede im Blutdruck werden durch Studien an der Ratte (CHEN & MENG, 1991) und am Menschen (WIINBERG et al., 1995; ELLIS et al., 2004) bestätigt. Die gemessenen systolischen Blutdrücke in den männlichen Untersuchungsgruppen waren jeweils signifikant höher als in den weiblichen Gruppen.

Die Befunde dieser Studie lassen eine Assoziation zwischen Blutdruckregulation und ER α in männlichen Tieren erkennen. Ebenso scheint der geschlechtsabhängige Unterschied in den Blutdruckparametern ER α vermittelt zu sein. Diese Annahme wird durch eine Untersuchung untermauert, die die Bedeutung eines Restriktionsfragment-Längenpolymorphismuses (RFLP) des ER α -Gens für die Blutdruckregulation beim Menschen analysierte (ELLIS et al., 2004). Das bialele RFLP-System kombiniert mit der phänotypischen Blutdruckuntersuchung zeigte bei der männlichen Untersuchungsgruppe zwei Allelkombinationen auf („aa“ und „Aa“), die mit einem signifikant erhöhten SBP assoziiert waren im Vergleich zur dritten Allelkombination „AA“. In der weiblichen

Untersuchungsgruppe hingegen konnte keine Verbindung zwischen dem untersuchten ER α RFLP und dem SBP aufgedeckt werden. Eine Verknüpfung zwischen ER α -Genotyp und diastolischen Blutdruckparameter wurde von den Autoren nicht festgestellt.

Die geschlechtsabhängige Auswirkung der ER α -Defizienz auf die Blutdruckparameter ist möglicherweise auf die heterogene Verteilung der ER α und ER β in weiblichen und männlichen Gefäßen zurückzuführen. In humanen weiblichen vaskulären glatten Muskelzellen ist der vorherrschende Östrogenrezeptor ER β . In männlichen Zellen werden der ER α und der ER β gleich exprimiert (HODGES et al., 2000). Untersuchungen an ER β -defizienten Mäusen liefern Hinweise, dass der ER β vasodilatatorisch wirkt. In Blutgefäßen von Mäusen verminderte Östrogen die Vasokonstriktion mittels einer ER β induzierten Zunahme der iNOS Expression. Eine antagonistische Rolle dazu übernimmt der ER α (ZHU et al., 2002). Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass der erniedrigte Blutdruck in weiblichen Tieren auf eine höhere Vasodilatation der Gefäße, sprich auf einen geringeren totalen peripheren Widerstand, zurückzuführen ist. Der ER α scheint in weiblichen Tieren wegen einer niedrigen Expression im Rahmen der Blutdruckregulation weitgehend ohne Einfluss zu sein. Der in männlichen Tieren vermehrt exprimierte ER α scheint somit den erhöhten Blutdruck zu vermitteln. Das Fehlen dieses Rezeptors führt zu einer Abnahme des Blutdruckes auf Werte weiblicher Tiere. Dieser hypertensive Effekt von ER α wird durch die Befunde von ZHU et al. (2002), erhöhte DBP und SBP in männlichen ER β KO Mäusen, unterstützt. In männlichen Tieren ist der ER α also aktiv an der Blutdruckregulation beteiligt und verursacht die geschlechtsspezifischen Unterschiede. Basierend auf Untersuchungsergebnissen von TOWNE et al. (1997) sprechen ELLIS et al. (2004) von einer Genotyp Geschlechtsinteraktion, in der der Effekt des Genotyps abhängig ist von der physiologischen Umgebung in der dieser exprimiert wird. Dies könnte erklären, warum der ER α in männlichen Tieren einen Einfluss auf die Blutdruckregulation ausübt und in weiblichen Mäusen eventuell nicht.

Die Ursachen einer peripheren Druckveränderung können sowohl im Gefäßsystem als auch im Herzen liegen. Die Herzfrequenzen der untersuchten Tiere waren nicht signifikant unterschiedlich (Kapitel 3.7.2). Der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP, Abbildung 3.51) war in männlichen WTs im Vergleich zu männlichen ER α KOs und weiblichen WTs signifikant erhöht. Die Parameter der weiblichen Gruppen unterschieden sich kaum voneinander. Im Bereich der kardialen Druckentwicklung ist also auch ein ER α

verursachter Geschlechtsunterschied zu erkennen. Als Maß für die Kontraktilität des Herzens gilt *in vivo* die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit in der isovolumetrischen Anspannungsphase (dp/dt_{\max}) und die Auswurffraktion (Schmidt, Lang, 2007). Die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit stellt ein Maß für die passive Dehnbarkeit des Ventrikels dar ($-dp/dt_{\min}$). Die gemessenen maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeiten in weiblichen und männlichen ER α KOs zeigten eine deutliche Tendenz zur geringen Kontraktilität, die Abnahme war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.52). Geschlechtsabhängige Unterschiede wurden bei diesem Parameter nicht festgestellt. Die tendenziell verminderte Kontraktilität der ER α KOs wird jedoch durch die *in vitro* Untersuchungen der Kontraktilität gestützt. Die Relaxation nahm in ER α KOs beiderlei Geschlechts geringfügig ab. Es bestand eine geringe Tendenz zur schnelleren Relaxation in männlichen Tieren beider Gruppen (Abbildung 3.52).

Der hier beobachtete Geschlechterunterschied im LVSP wurde ebenso von BEYER et al. (2001) bei Ratten beschrieben. Die Abnahme des LVSP in männlichen ER α KOs resultiert möglicherweise aus der beobachteten verminderten SERCA 2a Expression (vgl. Kapitel 4.2.3). MÜLLER et al. (2003) zeigten in einem „working heart“ Modell an Rattenherzen einen Zusammenhang zwischen SERCA 2a Expression und LVSP auf. Transgene Ratten, welche die SERCA 2a überexprimierten, entwickelten einen signifikant höheren LVSP und dp/dt als ihre Kontrollen. Die Untersuchungen fanden bei einer konstanten Stimulationsfrequenz von 300 Schlägen/min statt. Die fehlende Signifikanz des dp/dt Parameters in der vorliegenden Untersuchung könnte aus den hohen Standardabweichungen resultieren. Diese wiederum ergeben sich vermutlich aus den variierenden Herzfrequenzen der untersuchten Tiere. Eine weitere mögliche Erklärung für die Absenkung des LVSP ist die Anpassung des intrakardialen Drucks an die Druckverminderung im peripheren System, vermutlich verursacht durch einen geringeren totalen peripheren Widerstand (siehe oben). In weiblichen Tieren beeinflusste die ER α -Defizienz weder den SBP noch die Hf. Der gleich bleibende LVSP ist daher mit diesen Ergebnissen konform. Auch molekularbiologisch konnte keine Verminderung der SERCA 2a Expression in weiblichen ER α KOs festgestellt werden (vgl. Kapitel 4.2.3).

Interessanterweise war der LVDP in ER α KO Mäusen nicht erhöht. Dies spricht für eine Aufrechterhaltung der kardialen Funktion in beiden Geschlechtern. Daher kann das an-

gestiegene Körpergewicht in den weiblichen ER α KO Tieren (Kapitel 4.3.1) nicht einer pathologischen Zunahme der Gesamtkörperflüssigkeit zugeschrieben werden.

4.3.3.1 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf die Hämodynamik unter Dobutamin-Stimulation

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems ist der primäre Mechanismus *in vivo* zur Steigerung der kardialen Kontraktilität (HOUSER & MARGULIES, 2003). Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung senkte zunächst eine zentrale Sympathikolyse (Kapitel 2.6.2) die körpereigene Sympathikusaktivität der weiblichen ER α KO Tiere und deren Kontrollen. Daraus resultierten basale Herzfrequenzen im Bereich von 288 ± 36 (WT) und 324 ± 84 (ER α KO) Schlägen/min. Anschließend wurde Dobutamin, ein β -Agonist, als sympathischer Stimulus appliziert.

Genotypunabhängig konnte die für β -Agonisten übliche chronotrope Wirkung beobachtet werden (Abbildung 3.53). Im Konzentrationsbereich bis 22 ng/g/min Dobutamin zeigten die Ergebnisse in beiden Gruppen einen positiven inotropen und lusitropen Effekt. Eine weitere Konzentrationserhöhung resultierte in einer deutlichen negativen Inotropie und Lusitropie in den ER α KO Tieren. Die Werte der WT Tiere hingegen blieben nahezu konstant (Abbildung 3.55). Die Erhöhung des LVSP in beiden Untersuchungsgruppen stellt einen weiteren β -adrenergen Effekt dar (Abbildung 3.54). Zusätzlich bewirkte die akute Applikation von 4, 8 und 10 ng/g/min Dobutamin einen signifikant höheren linksventrikulären Druckanstieg in den ER α -defizienten Tieren. Eine weitere Konzentrationserhöhung führte jedoch wieder zu einem linksventrikulären Druckabfall in diesen Mäusen. Der signifikant höhere LVSP spricht für eine ausgeprägtere Antwort der ER α -defizienten Weibchen auf β -adrenerge Substanzen, die negative Inotropie und der linksventrikuläre Druckabfall sprechen jedoch für eine geringere Dobutamintoleranz der ER α -defizienten Mäuse im Vergleich zu ihren Kontrollen.

Herzkatheteruntersuchungen an Mäusen bestätigen die erhobenen Befunde der positiven inotropen und chronotropen Wirkung des Dobutamins (MÜLLER et al., 2003; NEMOTO et al., 2002; TAKAOKA et al., 2002; MONTGOMERY et al., 2005). MÜLLER et al. (2002) verzeichneten ebenfalls eine Dobutamintoleranz, jedoch bei wesentlich höheren Dobutaminkonzentrationen (> 100 ng/g Körpergewicht) in C57BL/6 Mäusen. Dies manifestierte sich in einem linksventrikulären Druckabfall und Arrhythmien.

Die der positiven Inotropie zu Grunde liegenden Signalketten sind weitestgehend bekannt. Die Bindung von Dobutamin am β_1 -Rezeptor führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase mit Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Anschließend aktiviert cAMP die Proteinkinase A (PKA), welche u. a. Schlüsselproteine der elektro-mechanischen Kopplung (L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, Ryanodinrezeptoren und PLB) phosphoryliert. Die Stimulation des I_{Ca} und der SR Ca Aufnahme resultiert in einer erhöhten $[\text{Ca}]_i$ auf Einzelzellebene (BERS, 2001). Dies wiederum manifestiert sich *in vivo* in einer Erhöhung des LVSP und der linksventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit.

Aufgrund der vorliegenden Befunde und den Untersuchungsergebnissen von KAM et al. (2004 und 2005) ist eine Interaktion zwischen den Transduktionskaskaden der β_1 -adrenergen Rezeptoren und $\text{ER}\alpha$ in Betracht zu ziehen. Eine Stimulation mit 10 nM Isoprenalin, ein β_1 -Agonist, erhöhte die L-Typ Ca^{2+} -Kanal Aktivität und die $[\text{Ca}]_i$ in isolierten Kardiomyozyten ovariectomierter Ratten signifikant stärker als in denen von Kontrolltieren und ovariectomierten Ratten mit E2 Substitution. Ebenso verzeichneten die Autoren einen stärkeren Anstieg der Kontraktionskraft isolierter Herzen von ovariectomierten Ratten im „working heart“ Modell. Gleichzeitig war die basale und Isoprenalin induzierte PKA Aktivität in den ovariectomierten Ratten gesteigert (KAM et al., 2005). Des Weiteren zeigten KAM et al. (2004) und THAWORNKAIWONG et al. (2007), dass Östrogen die Expression von β_1 -Adrenorezeptoren im Herzen von weiblichen Ratten herunterreguliert. Basierend auf diesen Ergebnissen wäre ein möglicher Erklärungsansatz der vorliegenden Befunde, dass Östrogen via $\text{ER}\alpha$ die Expression der β_1 -Adrenorezeptoren vermindert und die PKA Aktivität in den weiblichen WT Mäusen absenkt. Hieraus resultiert eine verminderte L-Typ Ca^{2+} -Kanalaktivität, ein geringerer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg und in Folge dessen ein verminderter LVSP während Dobutamin-Stimulation. Die basal erhöhte PKA Aktivität in $\text{ER}\alpha$ -defizienten Tieren bleibt zu überprüfen, da im Gegensatz zu KAM et al. (2005) in diesen Tieren kein erhöhter LVSP im Vergleich zu den Kontrolltieren dokumentiert wurde (Abbildung 3.51 und Abbildung 3.54). Berücksichtigt werden müssen zusätzlich die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden. KAM et al. (2005) führten ihre Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten und am isolierten Herzen durch. Die in dieser Studie dargestellten Ergebnisse wurden *in vivo* erhoben. Sowohl der linksventrikuläre systolische Druckabfall bei höheren Dobutamin-Konzentrationen (Abbildung 3.54) als auch die negative

Inotropie und Lusitropie bei 33 und 40 ng/g/min Dobutamin der ER α -defizienten Mäuse wären durch eine mögliche vasodilatative Wirkung des Dobutamins bei hoher Konzentration erklärbar. Dobutamin ist ebenso ein schwach wirkendes α -Sympathomimetikum, welches die β_2 -sympathomimetisch-vasodilatierende Wirkung dieser Substanz antagonisiert (FORTH et al., 1987). Eine möglicherweise erhöhte Anzahl von β_2 -Adrenorezeptoren in den Gefäßen von ER α KO Mäusen könnte dazu führen, dass der periphere Widerstand absinkt und somit sekundär eine negative Inotropie und Lusitropie auftritt. Weitere Untersuchungen hierzu sind jedoch notwendig.

4.4 Abschließende Betrachtung

Abschließend ist in kritischer Würdigung der Untersuchungsergebnisse festzustellen, dass Östrogen die elektromechanische Kopplung des Herzens via ER α beeinflusst, ER β hingegen scheint bei diesem Vorgang funktionslos zu sein.

Die ER α -Defizienz verminderte die Sarkomerverkürzung sowohl bei weiblichen als auch männlichen Kardiomyozyten, die ER β -Defizienz hingegen war wirkungslos. Weder die signifikante Zunahme der L-Typ Ca²⁺-Stromamplitude in männlichen noch die unveränderten Werte der weiblichen ER α -defizienten Kardiomyozyten erklären den beobachteten negativ inotropen Effekt der ER α -Defizienz. Die verminderte „Post Rest“ Verkürzung männlicher ER α -defizienter Zellen deutet unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Befunde auf eine Inhibition der Kontraktion aufgrund eines reduzierten SERCA 2a/PLB Verhältnisses einhergehend mit einer verminderten SERCA 2a Aktivität hin. Bei weiblichen ER α -defizienten Tieren wären basierend auf den hier erhobenen und den Daten der Literatur entweder eine verminderte Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung oder eine Akt vermittelte Reduktion der Kontraktilität mögliche Erklärungsgründe für die verminderte Sarkomerverkürzung. In diesem Zusammenhang interessant wäre die Messung der [Ca²⁺]_i während der Sarkomerverkürzungsmessung mittels Fura-2-gefärbter Kardiomyozyten. Eine weitere Begründung für die Kontraktilitätsverminderung stellen verkürzte APDs dar. Die bisherigen Untersuchungen lieferten jedoch nur eine Tendenz der APD-Verkürzung, vermutlich weil die transmuralen Unterschiede der APDs nicht berücksichtigt worden sind. Exaktere Aussagen wären z.B. durch AP-Messungen an Apex-Zellen möglich. Darüber hinaus würde eine Studie über den Einfluss des ER α auf die an der Repolarisation beteiligten K⁺-Ionenströme mit zur Klärung der Ergebnisse

beitragen und die aufgrund der molekularbiologischen Untersuchung vermutete Erhöhung des I_{to} in männlichen ER α -defizienten Kardiomyozyten verifizieren oder falsifizieren. Zusammenfassend deuten die bisherigen Befunde auf eine ER α -vermittelte kontraktionssteigernde Wirkung des Östrogens auf zellulärer Ebene hin, wobei dieser Effekt vermutlich geschlechtsabhängig über unterschiedliche Signaltransduktionswege erreicht wird.

Auch die Aufhebung der geschlechtsspezifischen Unterschiede der WT Tiere im QT- und QT_c-Intervall, SBP, DBP und LVSP in ER α -defizienten Tieren weisen auf eine bedeutende Rolle des ER α bei der geschlechtsspezifischen Ausprägung des kardialen Phänotyps hin. Der periphere Blutdruck als auch der LVSP wird vor allem in männlichen Tieren durch den ER α modifiziert, resultierend in einer Erhöhung dieser Werte. Geschlechtsspezifische Unterschiede im EKG ergeben sich zum Teil aus einer ER α -vermittelten Verlängerung des QT_c-Intervalls in weiblichen Tieren. Östrogen ist anscheinend elementar an der Ausprägung des geschlechtsspezifischen kardialen Phänotyps beteiligt.

Exaktere Aussagen über den Einfluss des ER α auf die Expression von β_1 -Adrenorezeptoren im Herzen sind erst nach weiteren Untersuchungen möglich. Sinnvoll wäre die Bestimmung der Expressionslevel des β_1 -Adrenorezeptoren von weiblichen und männlichen ER α KO und WT Mäusen mittels Western Blots, um eventuelle ER α -vermittelte und geschlechtsspezifische Unterschiede aufzudecken. In diesem Zusammenhang interessant wären auch Sarkomerverkürzungsmessungen während β_1 -Stimulation mittels Isoprenalin. Ein prozentual stärkerer positiv inotroper Effekt des Isoprenalins bei weiblichen ER α KO-Mäusen im Vergleich zu WT Tieren würde die Vermutung einer erhöhten Expression von β_1 -Adrenorezeptoren in Herzen von weiblichen ER α KO Mäusen untermauern.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Geschlechtshormons Östrogen auf die elektromechanische Kopplung von Herzmuskelzellen bestimmt. Ziel dieser Studie war es, Kenntnisse über die genauen physiologischen Abläufe während der Kontraktion von Kardiomyozyten weiblicher und männlicher Tiere zu gewinnen. Primär sollte die genomische Wirkungsweise der Östrogenrezeptoren α und β dokumentiert und anschließend mit möglichen geschlechtsspezifischen Unterschieden in den Herz-Kreislaufparametern des vollständigen Organismus in Beziehung gesetzt werden. Auf diese Weise erfolgte eine Charakterisierung des kardialen Phänotyps der Östrogenrezeptor α Maus.

Es wurden Messungen an enzymatisch isolierten Ventrikelmyozyten von C57BL/6 Mäusen, weiblichen und männlichen Östrogenrezeptor α - (ER α KO), β -defizienten (ER β KO) Mäusen und deren Kontrollen (WT) durchgeführt. Die Bestimmung der Sarkomerverkürzung als Maß für die kardiale Kontraktilität erfolgte mittels eines optischen Messverfahrens. Patch-clamp-Untersuchungen ermittelten die Bedeutung des ER α für den L-Typ Ca²⁺-Strom und die Aktionspotentialdauer (APD). Molekularbiologische Untersuchungen erfassten Expressionsunterschiede einiger an der elektromechanischen Kopplung beteiligter Proteine (SR Ca²⁺-ATPase 2a (SERCA 2a), Phospholamban (PLB), spannungsabhängiger Kaliumkanal (Kv 4.3 und Kv 1.5)). Morphologische Untersuchungen, EKG Messungen und hämodynamische Messungen mittels Herzkatheter dienten zur Charakterisierung des kardialen Phänotyps der ER α KO Maus. Hierbei erfolgten die Registrierungen der Herzfrequenz, der EKG Parameter, der peripheren Blutdruckparameter und der kardialen Druckparameter.

Die wesentlichen Befunde lauten:

1. Murine Kardiomyozyten bildeten unter physiologischen Bedingungen (36°C, 1,8 mM Ca²⁺) eine biphasische Verkürzungs-Frequenz-Beziehung aus. Das Ausmaß der Kontraktilität der Kardiomyozyten und die Verkürzungs-Frequenz-Beziehungen waren u.a. vom Alter der Tiere und von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängig.

2. Der ER β übte keinen Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten aus. Der ER α hingegen wirkte geschlechtsunabhängig positiv inotrop und lusitrop.
3. In männlichen Kardiomyozyten verursachte die ER α -Defizienz eine signifikante Zunahme der L-Typ Ca²⁺-Stromamplitude. Die Werte der weiblichen ER α -defizienten Zellen unterschieden sich nicht von deren Kontrollen.
4. Die ER α -Defizienz verkürzte tendenziell die Aktionspotentialdauer bis zur 90%igen Repolarisation in beiden Geschlechtern, ausgeprägter in männlichen Zellen.
5. Der ER α regulierte geschlechtsspezifisch die Expression von Kv 4.3 und Kv 1.5.
6. Die ER α -Defizienz hob geschlechtsabhängige Unterschiede der WT Tiere im QT- und QT_c-Intervall (EKG), im systolischen und diastolischen Blutdruck und im linksventrikulären systolischen Druck auf.

Aus den Befunden wird geschlossen, dass der ER α eine wichtige Rolle für das Ausmaß der Kontraktilität sowohl in weiblichen als auch in männlichen Zellen spielt. Es handelt sich um einen genomisch vermittelten Einfluss, der geschlechtsspezifisch unterschiedlich ist. Ein in männlichen Zellen beteiligter Mechanismus an der positiven Inotropie ist die Beeinflussung der SERCA 2a und PLB Expression durch den ER α resultierend in einer Erhöhung des SERCA 2a/PLB Verhältnisses. Bei weiblichen Zellen wären eine veränderte Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung und/oder eine angestiegene relative Akt Phosphorylierung mögliche Erklärungsansätze für die positive Inotropie.

Die in vivo Daten deuten darauf hin, dass dem Östrogenrezeptor α ein wichtiger Einfluss bei der Ausprägung geschlechtsspezifischer Unterschiede in den EKG, Blutdruck- und Herzdruck-Parametern zu zuschreiben ist.

6 Literatur

- ACHENBACH, C., WIEMER, J., PREISLER, R. (1985). Isolation of adult ventricular myocytes for electrophysiological experiments. *Basic Res Cardiol* 80, Sup 1, 162.
- ALBERT, C. M., CHAE, C. U., GRODSTEIN, F., ROSE, L. M., REXRODE, K. M., RUSKIN, J. N., STAMPFER, M. J., MANSON, J. E. (2003). Prospective study of sudden cardiac death among women in the United States. *Circulation* 107, 2096-2101.
- ANTOONS, G., MUBAGWA, K., NEVELSTEEN, I., SIPIDO, K. R. (2002). Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and $[Ca^{2+}]_i$ transients in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 543.3, 889-898.
- ARIAS-LOZA, P.-A., HU, K., DIENESCH, C., MEHLICH, A. M., KÖNIG, S., JAZBUTYTE, V., NEYSES, L., HEGELE-HARTUNG, C., FRITZMEIER, K. H., PELZER, T. (2007). Both estrogen receptor subtypes, α and β , attenuate cardiovascular remodeling in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension* 50, 1-7.
- BABIKER, F. A., DE WINDT, L. J., VAN EICKELS, M., GROHÉ, C., MEYER, R., DOEVENDANS, P. A. (2002). Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* 53, 709-719.
- BALAGURU, D., HADDOCK, P. S., PUGLISI, J. L., BERS, D. M., COETZEE, W. A., ARTMAN, M. (1997). Role of sarcoplasmic reticulum in contraction and relaxation of immature rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2747-2757.
- BANIAHMAD, C., NAWAZ, Z., BANIAHMAD, A., GLEESON, M. A. G., TSAI, M. J., O'MALLEY, B.W. (1995). Enhancement of human estrogen receptor activity by SPT6: a potential coactivator. *Mol Endocrinol* 9, 34-43.
- BARRY, D. M. & NERBONNE, J. M. (1996). Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu Rev Physiol* 58, 363-394.

- BARRY, D. M., XU, H., SCHUESSLER, R. B., NERBONNE, J. M. (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT Syndrome, and a cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α subunit. *Circ Res* 83, 560-567.
- BAZETT, H. (1920). An analysis of the time relationship of electrograms. *Heart* 7, 353-370.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRUYER, L., (2007). *Stryer Biochemie*, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Oxford, Heidelberg, Berlin.
- BERGER, F., BORCHARD, U., HAFNER, D., PÜTZ, I., WEIS, T. M. (1997). Effects of 17 β -estradiol on action potentials and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356, 788-796.
- BERS, D. M. (2000). Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 87, 275-281.
- BERS, D. M. (2001). *Excitation–contraction coupling and cardiac contractile force*, edn 2, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.
- BERS, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.
- BEYER, M. E., YU, G., HANKE, H., HOFFMEISTER, H. M. (2001). Acute gender-specific hemodynamic and inotropic effects of 17 β -estradiol on rats. *Hypertension* 38, 1003-1010.
- BLUHM, W. F., KRANIAS, E. G., DILLMANN, W. H., MEYER, M. (2000). Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol* 278, H249-H255.
- BONDARENKO, V. E., SZIGETI, G. P., BETT, G. C. L., KIM S., RASMUSSEN, R. L. (2004). Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol* 287, H1378-H1403.

- BORZAK, S., MURPHY, S., MARSH, J. D. (1991). Mechanisms of rate staircase in rat ventricular cells. *Am J Physiol* 260, H 884-H892.
- BOUCHARD, R. A., CLARK, R. B., GILES W. R. (1995). Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes: action potential voltage-clamp measurements. *Circ Res* 76, 790-801.
- BOWLING, N., BLOOMQUIST, W. E., COHEN, M. L., BRYANT, H. U., COLE, H. W., MAGEE, D. E., ROWLEY, E. R., VLAHOS, C. J. (1997). Effects of prolonged ethinyl estradiol treatment on calcium channel binding and in vivo calcium-mediated hemodynamic responses in ovariectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 218-225.
- BRANDENBERGER, A. W., TEE, M. K., LEE, J. Y., CHAO, V., JAFFE, R. B. (1997). Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3509-3512.
- BRETTE F. & ORCHARD, C. (2003). T-tubule function in mammalian cardiac myocytes (2003). *Circ Res* 92, 1182-1192.
- BRIXIUS, K., HOISCHEN, S., REUTER, H., LASEK, K., SCHWINGER, R. H. (2001). Force/shortening –frequency relationship in multicellular muscle strips and single cardiomyocytes of human failing and nonfailing hearts. *J Card Fail* 7, 335-341.
- BROUILLETTE, J., TRÉPANIÉ-BOULAY, V., FISET, C. (2003). Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 546, 403-413.
- BROUILLETTE, J., RIVARD, K., LIZOTTE, E., FISET, C. (2005). Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res* 65, 148-157.
- BROWN, A. M., LEE, K. S., POWELL, T. (1981). Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 318, 479-500.

- BUNONE, G., BRIAND, P. A., MIKSICEK, R. J., PICARD, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174-2183.
- BUPHA-INTR, T. & WATTANAPERMPHOL J. (2006). Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 291, H1101-H1108.
- BURKE, J. H., EHLERT, F. A., KRUSE, J. T., PARKER, M. A., GOLDBERGER, J., J., KADISH, A. H. (1997). Gender-specific differences in the QT interval and the effects of the autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *Am J Cardiol* 79, 178-181.
- CAPASSO, J. M., REMILY, R. M., SMITH, R. H., SONNENBLICK, E. H. (1983). Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res Cardiol* 78, 156-171.
- CHEN, Z., YUHANNA, I. S., GALCHEVA-GARGOVA, Z., KARAS, R. H., MENDELSON, M. E., SHAUL, P. W. (1999). Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103, 401-406.
- CHENG, J. (2006). Evidences of the gender-related differences in cardiac repolarization and the underlying mechanisms in different animal species and human. *Fundam Clin Pharmacol* 20, 1-8.
- CHENG, Y. F., & MENG, Q. C. (1991). Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci* 48, 85-96.
- CHENG, H., LEDERER, M. R., XIAO, R. P., GOMEZ, A. M., ZHOU, Y. Y., ZIMAN, B., SPURGEON, H., LAKATTA, E. G., LEDERER, W. J. (1996). Excitation-contraction coupling in heart: new insights from Ca^{2+} sparks. *Cell Calcium* 20, 129-140.
- CHIN, T. K., FRIEDMANN, W. F., KLITZNER, T. S. (1990). Developmental changes in cardiac myocyte calcium regulation. *Circ Res* 67, 574-579.

- CHU, S. C., CHOU, Y. C., LIU, J. Y., CHEN, C. H., SHYU, J. C., CHOU, F. P. (1999). Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 64, 2299-2306.
- CHU, H. C., GOLDSPIK, P., KOWALSKI, J., BECK, J., SCHWERTZ, D. W. (2006). Effect of estrogen on calcium-handling proteins, β -adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sci* 79, 1257-1267.
- CITTADINI, A., MONTI, M. G., IACCARINO, G., RELLA, F. D., TSICHLIS, P. N., GIANNI, A. DI, STRÖMER, H., SORRIENTO, D., PESCHLE, C., TRIMARCO, B., SACCÀ, L., CONDORELLI, G. (2006). Akt enhances myocardial contractility and intracellular calcium handling. *Gene Ther* 13, 8-19.
- COUSE, J. F., CURTIS, S. W., WASHBURN, T. F., LINDZEY, J., GOLDING, T. S., LUBAHN, D. B., SMITHIES, O., KORACH, K. S. (1995). Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the oestrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 9, 1441-1454.
- COUSE, J. F. & KORACH, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20, 358-417.
- CURL, C. L., WENDT, I. R., KOTSANAS, G. (2001). Effects of gender on intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in rat cardiac myocytes. *Pflügers Arch* 441, 709-716.
- CURL, C. L., WENDT, I. R., CANNY, B. J., KOTSANAS, G. (2003). Effects of ovariectomy and 17β -oestradiol replacement on $[Ca^{2+}]_i$ in female rat cardiac myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 489-494.
- DELBRIDGE, L. M. & ROOS, K. P. (1997). Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29, 11-25.
- DILLY, K. W., ROSSOW, C. F., VOTAW, V. S., MEABON, J. S., CABARRUS, J. L., SANTANA, L. F. (2006). Mechanisms underlying variations in excitation-contraction coupling across the mouse left ventricular free wall. *J Physiol* 572, 227-241.

- DOEVENDANS, P. A., DAEMEN, M. J., DE MUINCK, E. D., SMITS, J. F. (1998). Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 39, 34-49.
- DRICI, M. D., BURKLOW, T. R., HARIDASSE, V., GLAZER, R. I., WOOSLEY, R. L. (1996). Sex hormones prolong the QT Interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation* 94, 1471-1474.
- DUPONT, S., KRUST, A., GANSMULLER, A., DIERICH, A., CHAMBON, P., MARK, M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277-4291.
- ECKERT, R. & TILLOTSON, D. L. (1981). Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in caesium-loaded giant neurons of *Aplysia californica*. *J Physiol Lond* 314, 265-280.
- EICKELS VAN, M., GROHÉ, C., CLEUTJENS, J. P. M., JANSSEN, B. J., WELLENS, H. J. J., DOEVENDANS, P. A. (2001). 17 β -estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 104, 1419-1423.
- EICKELS VAN, M., PATTEN, R. D., ARONOVITZ, M. J., ALSHEIKH-ALI, A., GOSTYLA, K., CELESTIN, F., GROHÉ, C., MENDELSON, M. E., KARAS, R. H. (2003). 17 β -estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 41, 2084-2092.
- ELLIS, J. A., INFANTINO, T., HARRAP, S. B. (2004). Sex dependent association of blood pressure with oestrogen receptor genes ER α and ER β . *J Hypertens* 22, 1127-1131.
- ENDO, M. (2004). Force-frequency relationship in intact ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol* 500, 73-86.
- ENMARK, E., PELTOHUIKKO, M., GRANDIEN, K., LAGERCRANTZ, S., LAGERCRANTZ, J., FRIED, G., NORDENSKJOLD, M., GUSTAFSSON, J. A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localisation and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-4265.

- ENMARK, E. & GUSTAFSSON, J.-A. (1999). Oestrogen receptors – an overview. *J Internal Medicine* 246, 133-138.
- ESCOBAR, A. L., RIBEIRO-COSTA, R., VILLALBA-GALEA, C., ZOGHBI, M. E., PÉREZ, C. G., MEJIA-ALVAREZ, R. (2003). Developmental changes of intracellular Ca^{2+} transients in beating rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H971-H978.
- FABIATO, A. (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 247-289.
- FAROWSKI, F. (2004). Einfluss von Östrogenrezeptor α und Östrogenrezeptor β auf die Regulation von Signalkaskaden im Myokard der Maus. Diplomarbeit, Univ. Bielefeld.
- FISSET, C., CLARK, R. B., LARSEN, T. S., GILES, W. R. (1997). A rapidly activating sustained K^+ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol* 504, 557-563.
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. (HRSG.). *Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 1987, S. 136.
- FRATICELLI, A., JOSEPHON, R., DANZIGER, R., LAKATTA, E. SPURGEON, H. (1989). Morphological and contractile characteristics of rat cardiac myocytes from maturation to senescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 257, H259-H265.
- GAO, W. D., PEREZ, N. G., MARBAN, E. (1998). Calcium cycling and contractile activation in intact mouse cardiac muscle. *J Physiol* 507, 175-184.
- GARDIN, J. M., WAGENKNECHT, L. E., ANTON-CULVER, H., GIDDING, S., KUROSAKI, T., WONG, T. D., MANOLIO, T. A. (1995). Relationship of cardiovascular risk factors to echocardiographic left ventricular mass in healthy young black and white adult men and women. *Circulation* 92, 380-387.

- GASSEN, H. G. & SCHRIMPF, G. (Hrsg.). *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 1999, S. 19-26.
- GERDTS, E., ZABALGOITIA, M., BJORNSTAD, H., SVENDSEN, T. L., DEVEREUX, R. B. (2001). Gender differences in systolic left ventricular function in hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy (the LIFE study). *Am J Cardiol*, 980-983.
- GREEN, S., WALTER, P., KUMAR, V., KRUST, A., BORNET, J. M., ARGOS, P., CHAMBON, P. (1986). Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature* 320, 134-139.
- GROHÉ, C., KAHLERT, S., LOBBERT, K., MEYER, R., LINZ, K. W., KARAS, R. H., VETTER, H. (1996). Modulation of hypertensive heart disease by estrogen. *Steroids* 61, 201-204.
- GROHÉ, C., KAHLERT, S., LÖBBERT, K., VETTER, H., NEYSES, L. (1997). Cardiac myocytes and cardiac fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 416, 107-112.
- GRONEMEYER, H. (1991). Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet* 25, 89-123
- GRUBER, C. J., TSCHUGGUEL, W., SCHNEEBERGER, C., HUBER, J. C. (2002). Production and actions of estrogen. *N Engl J Med* 346, 340-352.
- GUO, W., XU, H., LONDON, B., NERBONNE, J. M. (1999). Molecular basis of transient outward K⁺ current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 521.3; 587-599.
- GUSTAFSSON, J-A. (1999). Estrogen receptor β – a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163, 379-383.

- HADDOCK P. S., COETZEE, W. A., CHO, E., PORTER, L., KATOH, H., BERS, D. M., JAFRI, M. S., ARTMAN, M. (1999). Subcellular $[Ca^{2+}]_i$ gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 85, 415-427.
- HADLEY, R. W. & HUME, J. R. (1987). An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels in guinea.pig myocytes. *J Physiol* 389, 205-222.
- HAGENDORFF, A., SCHUMACHER, B., KIRCHHOFF, S., LÜDERITZ, B., WILLECKE, K. (1999). Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transophageal stimulation. *Circulation* 99, 1508-1515.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85-100.
- HEINEKE, J. & MOLKENTIN, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 589-600.
- HIHI, A. K. & WAHLI, W. (1999). Structure and function of the estrogen receptor. In: OETTEL, M. & SCHILLINGER, E. (Hrsg.) *Estrogens and antiestrogens I*, Springer Verlag Heidelberg, S. 111-125.
- HINKLE, L. & THALER, H. T. (1982). Clinical classification of cardiac deaths. *Circulation* 65, 457-464.
- HINTZ, K. K., WOLD, L. E., COLLIGAN, P. B., SCOTT, G. I., LEE, K. J., SOWERS, J. R., REN, J. (2001). Influence of ovariectomy on ventricular myocyte contraction in simulated diabetes. *J Biomed Sci* 8, 307-313.
- HODGES, Y. K., TUNG, L., YAN, X.-D., GRAHAM, J. D., HORWITZ, K. B., HORWITZ, L. D. (2000). Estrogen Receptor α and β prevalence of estrogen receptor β mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation* 101, 1792-1798.

- HOUSER, S. R., & MARGULIES, K. B. (2003). Is depressed myocytes contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res* 92, 350-358.
- HUSSE, B. & WUSSLING, M. (1996). Developmental changes of calcium transients and contractility during the cultivation of rat neonatal cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 163/164, 13-21.
- ITO, K., YAN, X., TAJIMA, Z. S., BARRY, W. H., LORELL, B. H. (2000). Contractile reserve and intracellular calcium regulation in mouse myocytes from normal and hypertrophied failing hearts. *Circ Res* 87, 588-595.
- JAMES, A. F., ARBERRY, L. A., HANCOX, J. C. (2004). Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig. *Basic Res Cardiol* 99, 183-192.
- JIANG, C., POOLE-WILSON, P. A., SARREL, P. M., MOCHIZUKI, S., COLLINS, P., MACLEOD, K. T. (1992). Effect of 17 β -oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 106, 739-745.
- JOHNSON, B. D., ZHENG, W., KORACH, K. S., SCHEUER, T., CATTERALL, W. A., RUBANYI, G.M. (1997). Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol* 110, 135-140.
- KAM, K. W., QI, J. S., CHEN, M., WONG, T. M. (2004). Estrogen reduces cardiac injury and expression of β_1 -adrenoceptor upon ischemic insult in rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 8-15.
- KAM, K. W., KRAVTSOV, G. M., LIU, J., WONG, T. M. (2005). Increased PKA activity and its influence on isoprenaline-stimulated L-type Ca²⁺ channels in the heart from ovariectomized rats. *Br J Pharmacol* 144, 972-981.
- KANNEL, W. B., HORTLAND, M. C., MCNAMARA, P. M., GORDON, T. (1976). Menopause and risk of cardiovascular disease. The Framingham study. *Ann Int Med* 85, 447-452.

- KANNEL, W. B., WILSON, P. W. F., D'AGOSTINO, R. B. (1998). Sudden coronary death in women. *Am Heart J* 136, 205-212.
- KAPRIELIAN, R., WICKENDEN, A. D., KASSIRI, Z., PARKER, T. G., LIU, P. P. (1999). Relationship between K^+ channel down-regulation and $[Ca^{2+}]_i$ in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 517, 229-245.
- KASS, R. S. & SANGUINETTI, M. C. (1984). Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 84, 705-726.
- KATO, S., ENDOH, H., MASUHIRO, Y., KITAMOTO, T., UCHIYAMA, S., SASAKI, H., MASUSHIGE, S., GOTOH, Y., NISHIDA, E., KAWASHIMA, H., METZGER, D., CHAMBON, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.
- KATZENELLENBOGEN, B. S. & KORACH, K. S. (1997). A new actor in the estrogen receptor drama—enter ER β . *Endocrinology* 138, 861-862.
- KIM, Y.-K., KIM, S.-J., YATANI, A., HUANG, Y., CASTELLI, G., VATNER, D. E., LIU, J., ZHANG, Q., DIAZ, G., ZIEBA, R., THAISZ, J., DRUSCO, A., CROCE, C., SADOSHIMA, J., CONDORELLI, G., VATNER, S. F. (2003). Mechanism of enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt. *J Biol Chem* 278, 47622-47628.
- KLEINIG, H. & MAIER, U. (1999). *Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, S. 122f.
- KLEINMANN, H. K., CANNON, F. B., LAURIE, G. W., HASSEL, J. R., AUMAILLEY, M., TERRANOVA, V., MARTIN, G. R., DUBOIS-DALQ, M. (1985). Biological activities of Laminin. *J Cell Biol* 27, 317-325.
- KLEINMAN, H. K., LUCKENBILL-EDDS, L., CANNON, F. W., SEPHEL, G. C. (1987). Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem* 166, 1-13.

- KLINGE, C. M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251.
- KORTE, T., FUCHS, M., ARKUDAS, A., GEERTZ, S., MEYER, R., GARDIWAL, A., KLEIN, G., NIEHAUS, M., DREXLER, H., FINK, K., GROHÉ, C. (2005). Female mice lacking estrogen receptor β display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity post myocardial infarction. *Circulation* 111, 2282-2290.
- KOSS, K. L. & KRANIAS, E. G. (1996). Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79, 1059-1063.
- KOCIC I., HIRANO, Y., HIRAOKA, M. (2001). Rate-dependent changes in action potential duration and membrane currents in hamster ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 443, 353-361.
- KREGE, J. H., HODGIN, J. B., COUSE, J. F., ENMARK, E., WARNER, M., MAHLER, J. F., SAR, M., KORACH, K. S., GUSTAFSSON, J. A., SMITHIES, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15677-15682.
- KUIPER, G. G., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J. A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 291-332.
- KUMAR, V. & CHAMBON, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55, 145-156.
- KURATOMI, S., MATSUOKA, S., SARAI, N., POWELL, T., NOMA, A. (2003). Involvement of Ca^{2+} buffering and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in the positive staircase of contraction in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 446, 347-355.
- LAYLAND, J. & KENTISH, J. C. (1999). Positive force- and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol* 276, H9-H18.

- LEBLANC, N., CHARTIER, D., GOSSELIN, H., ROULEAU, J.-L. (1998). Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J Physiol* 511.2, 533-548.
- LEE, K. S., MARBAN, E., TSIEN, R. W. (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 364, 395-411.
- LESOT, H., KÜHL, U., VON DER MARK, K. (1983). Isolation of a laminin-binding protein from muscle cell membranes. *EMBO J* 2, 861-865.
- LEVINSON, S., LIU, K., STAMLER, J, STAMLER, R., WHIPPLE, I., AUSBROOK, D., BERKSON, D. (1985) Ethnic differences in blood pressure and heart rate of Chicago school children. *Am J Epidemiol* 122, 366-377.
- LI, L., CHU, G., KRANIAS, G., BERS, D. M. (1998). Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CAMKII effects. *Am J Physiol* 274, H1335-H1347.
- LIAO, J. K. (2003). Cross-coupling between the oestrogen receptor and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Soc Trans* 31, 66-70.
- LIEW, R., MACLEOD, K. T., COLLINS, P. (2003). Novel stimulatory actions of the phytoestrogen genistein: effects on the gain of cardiac excitation-contraction coupling. *FASEB J* 17, 1307-1309.
- LIEW, R., STAGG, M. A., MACLEOD, K. T., COLLINS, P. (2004a). Raloxifene acutely suppresses ventricular myocyte contractility through inhibition of the L-type calcium current. *Br J Pharmacol* 142, 89-96.
- LIEW, R., STAGG, M. A., CHAN, J., COLLINS, P., MACLEOD, K. T. (2004b). Gender determines the acute actions of genistein on intracellular calcium regulation in the guinea-pig heart. *Cardiovasc Res* 61, 66-76.

- LIM, C. C., APSTEIN, C. S., COLUCCI, W. S., LIAO, R. (2000). Impaired cell shortening and relengthening with increased pacing frequency are intrinsic to the senescent mouse cardiomyocyte. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2075-2082.
- LIM, C. C., HELMES, M. H. B., SAWYER, D. B., JAIN, M., LIAO, R. (2001). High-throughput assessment of calcium sensitivity in skinned cardiac myocytes. *Am J Physiol* 281, H969-H974.
- LINZ, K. W. (1996). Der Verlauf des L-Typ Ca^{2+} -Stroms während eines Aktionspotentials unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Dissertation, Univ. Bonn.
- LINZ, K. W. & MEYER, R. (1998). The late component of L-type calcium current during guinea-pig cardiac action potentials and its contribution to contraction. *Pflügers Arch* 436, 679-688.
- LIU, B., HU, D., WANG, J., LIU, X. L. (1997). Effects of 17 beta-estradiol on early after-depolarizations and L-type Ca^{2+} currents induced by endothelin-1 in guinea pig papillary muscles and ventricular myocytes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19, 19-25.
- LUBAHN, D. B., MOYER, T. S., GOLDING, T. S., COUSE, J. F., KORACH, K. S., SMITHIES, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11162-11166.
- LUO, C-H. & RUDY, Y. (1994). A dynamic model of cardiac ventricular action potential. I. Simulation of ionic currents and concentration changes. *Circ Res* 74, 1071-1096.
- MAIER, L. S., BERS, D. M., PIESKE, B. (2000). Differences in Ca^{2+} -handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2249-2258.

- MANGELSDORF, D. J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHÜTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG, B. P., KASTNER, P., MARK, M., CHAMBON, P., EVANS, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- MARTIN, G. R. & TIMPL, R. (1987). Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol* 3, 57-85.
- MATSUI, T, NAGOSHI, T., ROSENZWEIG, A (2003). Akt and PI 3-Kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle* 2, 220-223.
- MATTHEWS J. & GUSTAFSSON, J. A. (2003). Estrogen signalling: a suitable balance between ER α and ER β . *Mol Interv* 3, 281-292.
- MENDELSON, M. E. & KARAS, R. H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340, 1801-1811.
- MENDELSON, M. E. & KARAS, R. H. (2005). Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 308, 1583-1587.
- MERRI, M., BENHORIN, J., ALBERTI, M., LOCATI, E., MOSS, A. J. (1989). Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation* 80, 1301-1308.
- MEYER, M., BLUHM, W. F., HE H., POST, R. S., GIORDANO, F. J., LEW, W. Y. W., DILLMANN, W. H. (1999). Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *Am J Physiol* 276, H779-H785.
- MEYER, R. (1989). Oberflächenstruktur, Membranströme und Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen. Habilitationsschrift, Univ. Bonn.
- MEYER, R., LINZ, K. W., SURGES, R., MEINARDUS, S., VEES, J., HOFFMANN, A., WINDHOLZ, O., GROHÉ, C. (1998). Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol* 83, 305-321.

- MITCHELL, G. F., JERON, A., KOREN, G. (1998). Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 274, H747-51.
- MONTGOMERY, D. E., RUNDELL, V. L. M., GOLDSPINK, P. H., URBONIENE, D., GEENEN, D. L., DE TOMBE, P. P., BUTTRICK, P. M. (2005). Protein Kinase C ϵ induces systolic cardiac failure marked by exhausted inotropic reserve and intact Frank-Starling mechanism. *Am J Physiol* 289, H1881-H1888.
- MUKHERJEE, R., CRAWFORD, F. A., HEWETT, K. W. SPINALE, F. G. (1993). Cell and sarcomere contractile performance from the same cardiocyte using video microscopy. *J Appl Physiol* 74, 2023-2033.
- MÜLLER, F. U., LEWIN, G., MATUS, M., NEUMANN, J., RIEMANN, B., WISUBA, J., SCHÜTZ, G., SCHMITZ, W. (2002). Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J* 17, 103-105.
- MÜLLER, O. J., LANGE, M., RATTUNDE, H., LORENZEN, H.-P., MÜLLER, M., FREY, N., BITTNER, C., SIMONIDES, W., KATUS, H. A., FRANZ, W.-M. (2003). Transgenic rat hearts overexpressing SERCA 2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res* 59, 380-389.
- NÄBAUER, M., CALLEWAERT, G., CLEEMANN, L., MORAD, M. (1989). Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science*, 244, 800-803.
- NAIR, R. R. & NAIR, P. (2001). Age-dependent variation in contractility of adult cardiac myocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 119-125.
- NAKAJIMA, T., IWASAWA, K., OONUMA, H., MORITA, T., GOTO, A., WANG, Y., HAZAMA, H. (1999). Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17β -estradiol in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 127, 429-440.

- NAMEKATA, I., TAKEDA, K., MORIWAKI, R., KAZAMA, A., SATO, A., TANAKA, H., SHIGENOBU, K. (2004). Role of sodium-calcium exchanger in excitation-contraction coupling of mouse myocardium. *J Pharmacol Sci* 94, Suppl I, 272p.
- NASSAR, R., REEDY, M. C., ANDERSON, P. A. W. (1987). Developmental changes in ultrastructure and sarcomere shortening of isolated rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 61, 465-483.
- NEMOTO, S., DEFREITAS, G., MANN, D. L., CARABELLO, B. A. (2002). Effects of changes in left ventricular contractility on indexes of contractility in mice. *Am J Physiol* 283, H2504-H2510.
- NERBONNE, J. M. (1998). Regulation of voltage-gated K^+ channel expression in the developing mammalian myocardium. *J Neurobiol* 37, 37-59.
- NERBONNE, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525.2, 285-298.
- NIEDERGERKE, R. (1956). The 'staircase' phenomenon and the action of calcium on the heart. *J Physiol* 134, 569-583.
- NIGGLI, E. & LEDERER, W. J. (1990). Voltage-independent calcium release in heart muscle. *Science* 26, 250, 565-8.
- NILIUS, B., HESS, P., LANSMAN, J. B., TSIEN, R. W. (1985). A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316, 443-446.
- NUEDLING, S., KAHLERT, S., LOEBBERT, K., DOEVEDANS, P. A., MEYER, R., VETTER, H. (1999). 17β -Estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res* 43, 666-674.
- NUMBERGER, M. & DRAGUHN, A. (1996). Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.

- PATTEN, R. D & KARAS, R. H. (2006). Estrogen replacement and cardiomyocyte protection. *Trends Cardiovasc Med*, 16, 69-75.
- PATTERSON, E., MA, L., SZABO, B., ROBINSON, C. P., THADANI, U. (1998). Ovariectomy and estrogen-induced alterations in myocardial contractility in female rabbits: role of the L-type calcium channel. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 586-591.
- PEARSON, T. A., BLAIR, S. N., DANIELS, S. R., ECKEL, R. H., FAIR, J. M., FORTMANN, S. P., FRANKLIN, B. A., GOLDSTEIN, L. B., GREENLAND, P., GRUNDY, S. M., HONG, Y., MILLER, N. H., LAUER, R. M., OCKENE, I. S., SACCO, R. L., SALLIS, J. F. JR, SMITH, S.C. JR, STONE, N. J., TAUBERT, K. A. (2002). AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: consensus panel guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic vascular diseases. *Circulation* 106, 388-391.
- PELZER, T., JAZBUTYTE, V., HU, K., SEGERER, S., NAHRENDORF, M., NORDBECK, P., BONZ, A. W., MUCK, J., FRITZMEIER, K.-H., HEGELE-HARTUNG, C., ERTL, G., NEYSES, L. (2005). The estrogen receptor- α agonist 16 α -LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 67, 604-612.
- PHAM, T. V, SOSUNOV, E. A., GAINULLIN, R. Z., DANILO, P., ROSEN, M. R. (2001). Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I_k-blocking drugs. *Circulation* 103, 2207-2212.
- PIESKE, B., MAIER L. S., BERS, D. M., HASENFUSS, G. (1999). Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium, *Circ Res* 85, 38-46.
- POLDER, H. R., WESKAMP, M., LINZ, K., MEYER, R. (2005). Voltage-Clamp and Patch-Clamp Techniques. In: Dhein, S., Mohr, F. W., Delmar, M. (Hrsg.). *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Springer Verlag, Berlin, 2005, 273-323.

- PRATT, W. B. & WELSH, M. H. (1994). Chaperone functions of heat shock proteins associated with steroid receptors. *Semin Cell Biol* 5, 83-93.
- PRIEBE, L. & BEUCKELMANN D. J. (1998). Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ Res* 82, 1206-1223.
- RACHEZ, C. & FREEDMAN, L. P. (2001). Mediator complexes and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 13, 274-280.
- RASMUSSEN R. L., CLARK, J. W., GILES, W. R., ROBINSON, K., CLARK, R. B., SHIBATA, E. F., CAMPBELL, D. L. (1990). A mathematical model of electrophysiological activity in bullfrog atrial cell. *Am J Physiol* 259, H370-H389.
- RAUTAHARJU, P. M., ZHOU, S. H., WONG, S. (1992). Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 8, 690-695.
- REDEL, A., BAUMGARTNER, W., GOLENHOFEN, K., DRENCKHAHN, D., GOLENHOFEN, N. (2002). Mechanical activity and force-frequency relationship of isolated mouse papillary muscle: effects of extracellular calcium concentration, temperature and contraction type. *Pflügers Arch* 445, 297-304.
- REN, J., HINTZ, K. K., ROUGHEAD, Z. K. F., DUAN, J., COLLIGAN, P. B., REN, B. H., LEE, K. J., ZENG, H. (2003). Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *Am J Physiol* 284, H1800-H1807.
- ROTA, M., BONI, A., URBANEK, K., PADIN-IRUEGAS, M. E., KAJUSTRA, T. J., KUBO H., SONNENBLICK E. H., MUSSO, E., HOUSER, S. R., LERI, A., SUSSMANN, M. A., ANVERSA, P. (2005). Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility. *Circ Res* 97, 1332-1341.
- SABA, S., ZHU, W., ARONOVITZ, M. J., ESTES III, N. A. M., WANG, P. J., MENDELSON, M. E., KARAS, R. H. (2002). Effects of estrogen on cardiac electrophysiology in female mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13, 276-280.

- SAH, R., RAMIREZ, R. J., KAPRIELIAN, R., BACKX P. H. (2001). Alterations in action potential profile enhance excitation-contraction coupling in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 533.1, 201-214.
- SAH, R., OUDIT, G. Y., NGUYEN, T-T. T., LIM, H. W., WICKENDEN, A. D., WILSON, G. J., MOLKENTIN, J. D., BACKX, P. H. (2002). Inhibition of calcineurin and sarcolemmal Ca^{2+} influx protects cardiac morphology and ventricular function in $K_v4.2N$ transgenic mice. *Circulation* 105, 1850-1856.
- SANGUINETTI, M. C. (2002). Reduced transient outward K^+ current and cardiac hypertrophy. Causal relationship or epiphenomenon. *Circ Res*, 90, 497-499.
- SCHAIBLE, T. F., MALHOTRA, A., CIAMBRONE, G., SCHEUER, J. (1984). The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. *Circ Res* 54, 38-49.
- SCHEUER, J., MALHOTRA, A., SCHAIABLE, T. F., CAPASSO, J. (1987). Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts. *Circ Res* 61, 12-19.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. (Hrsg.). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 30. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2007.
- SHATTOCK M.J. & BERS, M.D. (1989). Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 256, C813-C822.
- SHERMAN-GOLD, R. (1993). *The axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques*, Axon Instruments Inc, Foster City, Ca. USA.
- SIMONCINI, T., MANNELLA, P., FORNARI, L., CARUSO, A., VARONE, G., GENAZZANI, A. R. (2004). Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69, 537-542.
- SIPIDO, K. R., CALLEWAERT, G., CARMELIET, E. (1995). Inhibition and rapid recovery of Ca^{2+} current during Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 76, 102-109.

- SITZLER, G., LENZ, O., KILTER, H., LA ROSEE, K., BOHM, M. (1996). Investigation of the negative inotropic effects of 17 beta-oestradiol in human isolated myocardial tissues. *Br J Pharmacol* 119, 43-48.
- SKAVDAHL, M., STEENBERGEN, C., CLARK, J., MYERS, P., DEMIANENKO, T., MAO, L., ROCKMAN, H. A., KORACH, K. S., MURPHY, E. (2005). The beta estrogen receptor mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol* 288, H469-H476.
- SLUYSER, M., RIJKERS, A. W., DE GOEIJ, C. C., PARKER, M., HILKENS, J. (1988). Assignment of Estradiol receptor gene to mouse chromosome 10. *J Steroid Biochem* 31, 757-761.
- SNYDERS, D. J. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 42, 377-390.
- SONG, M., HELGUERA, G., EGHBALI, M., ZHU, N., ZAREI, M. M., OLCESE, R., TORO, L., STEFANI, E. (2001). Remodeling of Kv 4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem*, 276, 31883-31890.
- STRAMBA-BADIALE, M., LOCATI, E. H., MARTINELLI, A., COURVILLE, J., SCHWARTZ, P. J. (1997). Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-h holter recordings. *Eur Heart J* 18, 1000-1006.
- STUYVERS B. D., MCCULLOCH A. D., HUO, J., DUFF H. J., TER KEURS H. E. D. J. (2002). Effect of stimulation rate, sarcomere length and Ca^{2+} on force generation by mouse cardiac muscle. *J Physiol* 544.3, 817-830.
- SUDA, N. & KOKUBUN, S. (1994). The effect of extracellular Ca^{2+} concentration on the negative staircase of Ca^{2+} transient in field-stimulated rat ventricular cells. *Pflügers Arch* 429, 7-13.

- TAKAOKA, H., ESPOSITO, G., MAO, L., SUGA, H., ROCKMAN, H. A. (2002). Heart size-independent analysis of myocardial function in murine pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol* 282, H2190-H2197.
- TANABE, S., HATA, T., HIRAOKA, M. (1999). Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* 277, H 826-H833.
- THAWORNKAIWONG, A., PANTHARANONTAGA, J., WATTANAPERMPHOL, J. (2007). Hypersensitivity of myofilament response to Ca^{2+} in association with maladaptation of estrogen-deficient heart under diabetes complication. *Am J Physiol* 292, R844-R851.
- TIEMANN, K., WEYER, D., DJOUFACK, P. C., GHANEM, A., LEWALTER, T., DREINER, U., MEYER, R., GROHÉ, C., FINK, K. B. (2003). Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol* 284, H464-H474.
- TIMPL, R., ROHDE, H., ROBEY, P. G., RENNARD, S. I., FOIDART, J. M., MARTIN, G. R. (1979). Laminin – a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254, 9933-9937.
- TOWNE, B., SIERVOGEL, R. M., BLANGERO, J. (1997). Effects of genotype-by-sex interaction on quantitative trait linkage analysis. *Genet Epidemiol* 14, 1053-1058.
- TRAFFORD, A. W., DIAZ, M. E., EISNER, D. A. (2001). Coordinated control of cell Ca^{2+} loading and triggered release from the sarcoplasmic reticulum underlies the rapid inotropic response to increased L-Type Ca^{2+} current. *Circ Res* 88, 195-201.
- TREMBLAY G. B., TREMBLAY, A., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A., LABRIE, F., GIGUERE, V. (1997). Cloning chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol Endocrinol* 11, 353-365.

- TRÉPANIÉ-BOULAY, V., ST-MICHEL, C., TREMBLAY, A., FISET, C. (2001). Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 89, 437-444.
- UMESONO, K. & EVANS, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.
- VERMEULEN, A., KAUFMANN, J.M., GOEMAERE, S., VAN POTTELBERG, I. (2002). Estradiol in elderly men. *Aging Male* 5, 98-102.
- VETTER, R., STUDER, R., REINECKE, H., KOLAR, F., OSTADALOVA, I., DREXLER, H. (1995). Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} -exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 27, 1689-1701.
- VILA PETROFF, M. G., PALOMEQUE, J., MATTIAZZI, A. R. (2003). Na^+ - Ca^{2+} exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium. *J Physiol* 550.3, 801-817.
- VIZGIRDA, V. M., WAHLER, G. M., SONDEGROTH, K. L., ZIOLO, M. T., SCHWERTZ, D. W. (2002). Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to β -adrenergic stimulation. *Am J Physiol* 282, H256-H263.
- WALTER, P., GREEN, S., GREEN, G., KRUST, A., BORNERT, J.-M., STAUB, A., JENSEN, E., SCRACE, G., WATERFIELD, M., CHAMBON, P. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7889-7893.
- WANG, Z., FENG, J., SHI, H., POND, A., NERBONNE, J. M., NATTEL, S. (1999). Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K^+ current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res* 84, 551-561.
- WETTWER, E., AMOS, G., GATH, J. ZERKOWSKI, H. R., REIDEMEISTER, J. C., RAVENS, U. (1993). Transient outward current in human and rat ventricular myocyte. *Cardiovasc Res* 27, 1662-1669.
- WICKENDEN, A. D., KAPRIELIAN, R., KASSIRI, Z., TSOPORIS, J. N., TSUSHIMA, R., FISHMAN, G. I., BACKX, P. H. (1998). The role of action potential prolongation and

- altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 312-323.
- WICKENDEN, A. D., LEE, P., SAH, R., HUANG, Q., FISHMANN, G. I., BACKX P. H. (1999). Targeted expression of a dominant-negative K_v 4.2 K^+ channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* 85, 1067-1076.
- WILLIAMS, B. A., DICKENSON, D. R., BEATCH, G. N. (1999). Kinetics of rate-dependent shortenings of action potential duration in guinea-pig ventricle; effects of I_{K1} and I_{Kr} blockade. *Br J Pharmacol* 126, 1426-1436.
- WIINBERG, N., HOEGHOLM, A., CHRISTENSEN H. R., BANG, L. E., MIKKELSEN, K. L., NIELSEN, P. E., SVENDSEN, T. L., KAMPMANN, J. P., MADSEN, N. H., BENTZON, M. W. (1995). 24-h ambulatory blood pressure in 352 Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens* 8, 978-986
- WU, Y. & ANDERSON, M. E. (2002). Reduced repolarization reserve in ventricular myocytes from female mice. *Cardiovasc Res* 53, 763-769.
- XU, H., GUO, W., NERBONNE, J. M. (1999a). Four kinetically distinct depolarization-activated K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 113, 661-677.
- XU H., BARRY, D. M., LI, H., BRUNET, S., GUO, W., NERBONNE, J. M. (1999b). Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation and triggered activity in mice expressing a dominant-negative $Kv2 \alpha$ subunit. *Circ Res* 85, 623-633.
- YAO, A. S., SU, Z., NONAKA, A., ZUBAIR, I., LU, L. Y., PHILIPSON, K. D., BRIDGE, J. H., BARRY, W. H. (1998). Effects of overexpressing of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger on $[Ca^{2+}]$ transients in murine ventricular myocytes. *Circ Res* 82, 657-665.

- YLIKOMI, T., BOCQUEL, M. T., BERRY, M., GRONEMEYER, H., CHAMBON, P. (1992). Co-operation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11, 3681-3694.
- ZOBEL, C., KASSIRI, Z., NGUYEN, T-T. T, MENG, Y., BACKX, P. H. (2002). Prevention of hypertrophy by overexpression of Kv4.2 in cultured neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 106, 2385-2391.
- ZHU, Y., BIAN, Z., LU, P., KARAS, R. H., BAO, L., COX, D., HODGIN, J., SHAUL, P. W., THORÉN, P., SMITHIES, O., GUSTAFSSON, J.-A., MENDELSON, M. E. (2002). Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor β . *Science* 295, 505-508.

Handbücher und Internetquellen

Fluorescence and Contractility System, Documentation, IonOptix, Milton, MA, USA

www.destatis.de, zuletzt am 01.02.2009

www.vetpharm.unizh.ch/TAK/05000000/00055999.01, zuletzt am 01.02.2009

7 Anhang

Tabellenverzeichnis

7.1 Entwicklungsbedingte Veränderungen der Sarkomerverkürzung

Tabelle 7.1: Verkürzungsgeschwindigkeit

Tabelle 7.2: Relaxationsgeschwindigkeit

Tabelle 7.3: Verkürzungsdauer

Tabelle 7.4: Zeitkonstante

7.2 Einfluss des Östrogenrezeptor β auf die Sarkomerverkürzung

Tabelle 7.5: Verkürzungsgeschwindigkeit männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

Tabelle 7.6: Relaxationsgeschwindigkeit männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

Tabelle 7.7: Verkürzungsdauer männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

Tabelle 7.8: Verkürzungsgeschwindigkeit weiblicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

Tabelle 7.9: Relaxationsgeschwindigkeit weiblicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

Tabelle 7.10 Verkürzungsdauer weiblicher ER β KO und WT Kardiomyozyten

7.3 Einfluss des Östrogenrezeptor α auf das Aktionspotential

Tabelle 7.11: Ruhemembranpotential weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Tabelle 7.12: Spitzenwerte des Aktionspotentials weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

Tabelle 7.13: Frequenzabhängiges Verhalten von Ruhemembranpotential, Spitzenwerte und APD₅₀ weiblicher und männlicher ER α KO und WT Kardiomyozyten

7.1 Entwicklungsbedingte Veränderung der Sarkomerverkürzung

Tabelle 7.1: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter weiblicher Kardiomyozyten der Altersgruppe (AG) 1, AG 2, AG 3 und AG 4 bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz. * $p < 0,05$ im Vergleich zu den entsprechenden Werten der AG 1.

Hz	Verkürzungsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]														
	AG 1			AG 2			AG 3			AG 4			AG 2-4		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	-2,94	1,31	9	-3,77	1,93	20	-4,83*	2,14	13	-3,15	1,36	12	-3,91	1,93	45
1	-2,37	1,19	11	-3,47	1,86	17	-3,97*	1,77	11	-3,13	1,38	9	-3,53*	1,71	37
2	-2,64	1,87	8	-3,30	2,11	14	-3,80	1,36	10	-2,83	1,12	12	-3,28	1,64	36
4	-2,43	2,00	10	-3,57	1,91	11	-4,39*	2,25	13	-3,99*	1,39	15	-4,00*	1,84	39
6	-1,99	0,85	10	-4,51*	2,17	10	-5,91*	2,58	12	-4,35*	1,86	14	-4,92*	2,26	36
8	-2,61	1,66	15	-4,53*	2,85	13	-6,04*	2,97	6	-3,96	1,53	9	-4,67*	2,55	28
10	-3,84	2,29	12	-4,02	1,94	12	-5,42	1,97	8	-4,04	1,44	7	-4,44	1,88	27

Tabelle 7.2: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Relaxationsgeschwindigkeit isolierter weiblicher Kardiomyozyten der Altersgruppen (AG) 1, AG 2, AG 3 und AG 4 bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz. * $p < 0,05$ im Vergleich zu den entsprechenden Werten der AG 1.

Hz	Relaxationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]														
	AG 1			AG 2			AG 3			AG 4			AG 2-4		
	MW	SD	N	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	1,47	1,06	9	2,26	1,76	20	2,98*	1,67	13	1,75	0,97	12	2,33	1,60	45
1	1,07	0,69	11	2,01*	1,36	17	2,30*	1,17	11	1,75	1,18	9	2,03*	1,25	37
2	1,37	1,53	8	1,75	1,34	14	2,17	1,05	10	1,47	1,03	12	1,77	1,17	36
4	1,36	1,61	10	2,24	1,54	11	2,87	1,86	13	2,53	1,79	15	2,56	1,72	39
6	1,01	0,75	10	2,80*	1,53	10	3,78*	2,17	12	3,33*	2,13	14	3,33*	1,98	36
8	1,61	1,62	15	3,42*	2,53	13	4,86*	2,39	6	2,72	1,94	9	3,50*	2,37	28
10	2,60	2,11	12	2,88	1,30	12	4,08	1,62	8	2,74	1,56	7	3,20	1,53	27

Tabelle 7.3: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Verkürzungsdauer isolierter weiblicher Kardiomyozyten der Altersgruppen (AG) 1, AG 2, AG 3 und AG 4 bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz.

Hz	Verkürzungsdauer [s]														
	AG 1			AG 2			AG 3			AG 4			AG 2-4		
	MW	SD	N	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,10	0,03	9	0,10	0,05	20	0,09	0,03	13	0,10	0,02	13	0,10	0,04	45
1	0,10	0,03	11	0,08	0,04	17	0,08	0,02	11	0,09	0,02	9	0,09	0,03	37
2	0,09	0,02	8	0,09	0,03	14	0,08	0,02	10	0,10	0,03	12	0,09	0,03	36
4	0,09	0,02	10	0,08	0,02	11	0,08	0,01	12	0,08	0,01	15	0,08	0,02	38
6	0,08	0,02	10	0,07	0,01	10	0,08	0,02	12	0,08	0,01	14	0,08	0,01	36
8	0,07	0,02	14	0,07	0,01	13	0,07	0,01	6	0,07	0,01	9	0,07	0,01	28
10	0,07	0,01	12	0,07	0,01	13	0,07	0,01	8	0,07	0,01	7	0,07	0,01	27

Tabelle 7.4: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der ersten (τ_1) und zweiten (τ_2) Zeitkonstante isolierter weiblicher Kardiomyozyten der Altersgruppen (AG) 1, AG 2, AG 3 und AG 4 bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz.

Hz	Zeitkonstante [s]																			
	AG 1					AG 2					AG 3					AG 4				
	MW	τ_1 SD	MW	τ_2 SD	n	MW	τ_1 SD	MW	τ_2 SD	n	MW	τ_1 SD	MW	τ_2 SD	n	MW	τ_1 SD	MW	τ_2 SD	n
0,5	7,33	0,72			9	10,90	0,34			8	8,68	1,11			8	7,58	0,18			8
1	2,67	0,22			9	3,88	0,07			9	5,54	0,30			7	3,53	0,08			9
2	1,59	0,13			9	1,69	0,09			9	2,52	0,21			9	1,48	0,07			8
4	1,75	0,10			9	0,62	0,04			4	0,76	0,11			9	0,39	0,04			9
6	0,06	0,01			4	0,08	0,02	2,15	0,35	4	0,02	0,03	1,81	2,52	5	0,07	0,02	1,66	0,20	9
8	0,06	0,01	1,00	0,11	8	0,07	0,01	1,39	0,21	6	0,04	0,02	1,10	0,11	5	0,12	0,03	0,90	0,09	5
10	0,07	0,02	1,03	0,11	5	0,01	0,02	0,94	0,11	8	0,04	0,02	0,99	0,12	5	0,08	0,02	0,84	0,09	6

7.2 Einfluss des Östrogenrezeptors β auf die Sarkomerverkürzung

Tabelle 7.5: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz.

Hz	Verkürzungsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]					
	WT			ER β KO		
	MW	SD	N	MW	SD	n
0,5	-4,58	2,03	27	-4,05	1,66	31
1	-4,14	1,78	36	-3,88	1,34	38
2	-3,57	1,48	37	-3,72	1,33	43
4	-4,09	1,58	24	-3,76	1,34	32
6	-3,96	1,31	22	-3,49	1,29	15
8	-4,62	2,32	27	-4,18	1,39	16
10	-5,09	2,14	16	-5,16	1,52	24

Tabelle 7.6: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Relaxationsgeschwindigkeit isolierter männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz.

Hz	Relaxationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]					
	WT			ER β KO		
	MW	SD	N	MW	SD	n
0,5	2,56	1,48	27	2,12	0,98	31
1	2,14	1,07	36	1,99	0,84	38
2	1,89	1,00	37	2,01	0,92	43
4	2,43	1,32	24	2,11	1,23	32
6	2,36	1,25	22	1,97	1,08	15
8	3,23	2,45	27	2,76	1,30	16
10	3,82	2,13	16	3,78	1,46	24

Tabelle 7.7: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Verkürzungsdauer isolierter männlicher ER β KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz. * $p < 0,05$

Hz	Verkürzungsdauer [s]					
	WT			ER β KO		
	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,08	0,03	27	0,08	0,02	31
1	0,08	0,02	36	0,08	0,02	38
2	0,08	0,02	37	0,07	0,03	43
4	0,07	0,02	24	0,07	0,01	32
6	0,07	0,01	22	0,07	0,02	15
8	0,06	0,01	27	0,07	0,01	16
10	0,06	0,01	16	0,07*	0,01	24

Tabelle 7.8: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter weiblicher ER β KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz. * $p < 0,05$

Hz	Verkürzungsgeschwindigkeit [μ m/s]					
	WT			ER β KO		
	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	-2,76	1,44	23	-2,91	1,96	23
1	-2,42	1,05	26	-2,68	1,67	24
2	-2,12	0,93	27	-2,50	1,35	19
4	-2,87	1,28	24	-3,16	1,66	19
6	-3,57	1,65	18	-4,37	2,82	7
8	-3,41	1,68	17	-4,55	1,84	9
10	-3,53	1,22	11	-5,22*	1,61	9

Tabelle 7.9: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Relaxationsgeschwindigkeit isolierter weiblicher ER β KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz. * $p < 0,05$

Hz	Relaxationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]					
	WT			ER β KO		
	MW	SD	N	MW	SD	n
0,5	1,25	0,72	23	1,51	1,74	23
1	1,09	0,67	26	1,26	0,91	24
2	0,92	0,58	27	1,17	0,72	19
4	1,47	0,82	24	1,60	0,95	19
6	2,26	1,71	18	2,32	1,50	7
8	1,98	1,27	17	2,65	1,57	9
10	2,07	0,82	11	3,23*	1,18	9

Tabelle 7.10: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) der Verkürzungsdauer isolierter weiblicher ER β KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz. * $p < 0,05$

Hz	Verkürzungsdauer [s]					
	WT			ER β KO		
	MW	SD	N	MW	SD	n
0,5	0,11	0,03	23	0,12	0,04	23
1	0,11	0,03	26	0,13	0,05	24
2	0,12	0,04	27	0,11	0,03	19
4	0,10	0,02	24	0,10	0,02	19
6	0,09	0,02	18	0,09	0,02	7
8	0,08	0,01	17	0,08	0,01	9
10	0,08	0,01	11	0,07*	0,01	9

7.3 Einfluss des Östrogenrezeptors α auf das Aktionspotential

Tabelle 7.11: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) des Ruhemembranpotentials von weiblichen und männlichen ER α KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz.

Hz	Ruhemembranpotential [mV]											
	WT						ER α KO					
	MW	♀ SD	n	MW	♂ SD	N	MW	♀ SD	n	MW	♂ SD	n
0,5	-71,38	2,94	22	-70,90	2,91	5	-70,58	3,65	14	-75,02	6,02	9
1	-70,80	3,18	25	-69,88	3,15	6	-70,17	3,5	14	-73,9	5,81	9
2	-69,82	3,84	25	-70,46	2,89	7	-69,05	3,25	15	-72,64	6,51	9
4	-69,16	3,65	20	-68,43	3,63	5	-68,04	4,12	14	-74,12	6,41	7
6	-68,45	3,63	18	-67,27	3,44	3	-68,17	3,85	12	-72,73	6,75	8
8	-66,32	4,92	10	-67,46	0,99	3	-66,44	3,12	9	-72,77	10,27	5
10	-65,72	5,42	6	-67,49	2,96	2	-66,04	3,12	9	-75,12	7,25	5

Tabelle 7.12: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) des Spitzenwertes von weiblichen und männlichen ER α KO und WT Kardiomyozyten bei Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz.

Hz	Spitzenwert [mV]											
	WT						ER α KO					
	MW	♀ SD	n	MW	♂ SD	N	MW	♀ SD	n	MW	♂ SD	n
0,5	59,30	4,27	22	53,26	7,19	5	53,69	7,13	14	52,92	9,11	9
1	58,35	5,57	25	52,45	6,75	6	54,68	7,59	14	52,34	10,06	9
2	58,46	6,16	25	50,93	8,60	7	53,42	8,39	15	53,79	13,42	9
4	59,28	9,09	20	50,04	11,38	5	51,36	6,99	14	52,36	14,17	7
6	58,67	9,59	18	49,84	10,64	3	54,98	6,36	12	53,52	16,62	8
8	64,08	11,47	10	60,68	20,14	3	54,03	11,45	9	51,88	18,93	5
10	60,50	13,02	6	55,92	1,87	2	55,65	12,79	9	44,27	5,86	5

Tabelle 7.13: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Anzahl (n) des frequenzabhängigen Verhaltens von Ruhemembranpotential, Spitzenwert und APD₅₀ Werten weiblicher WT Kardiomyozyten

Hz	WT ♀						n
	Ruhemembranpotential [mV]		Spitzenwert [mV]		APD ₅₀		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
0,5	-70,0	3,6	58,4	4,8	4,0	1,8	6
1	-69,4	3,9	57,5	7,8	3,8	2,0	6
2	-68,2	4,9	56,4	2,8	4,1	2,2	6
4	-68,1	3,3	56,1	3,2	3,8	2,2	6
6	-67,2	3,4	57,1	5,6	4,2	2,7	5
8	-68,3	6,4	64,8	9,3	2,8	0,5	4
10	-64,9	5,4	59,8	12,0	5,4	4,5	6

8 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Die verwendeten Quellen sind als solche gekennzeichnet.

Bonn, 25.02.2009

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die Ermöglichung der Arbeit sowie die stets freundliche und engagierte Betreuung und Unterstützung und die vielen kritischen und anregenden Diskussionen während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. Volker Herzog für die freundliche Betreuung an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Fachgruppe Biologie.

Herrn Prof. Dr. Christian Grohé für die dauernde Gesprächsbereitschaft und vielen wertvollen Tipps.

Herrn Prof. Dr. Klaus Fink und seinen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die Aufzucht, Genotypisierung und Bereitstellung der Östrogenrezeptor α und β Mäuse.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Physiologie II und meiner Arbeitsgruppe für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die überaus bereichernde Zusammenarbeit und wunderschöne Zeit –auch neben der Forschung– bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

- Gerrit Schumacher und Henning Kempelmann, die mich in die Welt der Sarkomerverkürzungsmessungen eingewiesen haben und jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.
- Frau Hanne Bock für die hervorragende, selbständige technische Unterstützung und die vielen anregenden und aufmunternden Gespräche.
- Frau Dr. Jutta Weisser-Thomas für die Einarbeitung in die Patch-Clamp-Technik und Herrn Dr. Martin van Eickels für die Einführung in die Herzkatheteruntersuchung.

- Herrn Dr. Michael Hans für den Aufbau einer Access Datenbank zur Verwaltung der Messergebnisse der Sarkomerverkürzungsmessungen.
- Herrn Rolf Beck, seinen Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt und Herrn Stephan Krüger, elektronische Werkstatt, für die hervorragende Lösung vieler kleiner und großer technischer Probleme an den Versuchständen.

Danken möchte ich auch meiner gesamten Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, Geduld und Interesse an meiner Arbeit während der gesamten Zeit.

Nicht zuletzt gilt mein innigster Dank Michael, der mich auf dem gesamten Weg liebevoll unterstützt hat.

11 Veröffentlichungen

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse wurden oder werden noch unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Veröffentlichungen:

TIEMANN, K., WEYER, D., DJOUFACK, P. C., GHANEM, A., LEWALTER, T., **DREINER, U.**, MEYER, R., GROHÉ, C., FINK, K. B. (2003). Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H464-H474.

DREINER, U., FAROWSKI, F., FINK, K.B., DJOUFACK, P.C., SWANDULLA, D., WEISSERTHOMAS, J., GROHÉ, C., MEYER, R. (in Vorbereitung). Estrogen receptor α mediates gender related differences in cardiovascular phenotype.

Veröffentlichte Vorträge und Posterpräsentationen:

DREINER, U., SCHUHMACHER, G. F., BOCK, H., DJOUFACK, P. C., FINK, K. B., GROHÉ, C., MEYER, R. (2003). Influence of oestrogen receptor α and β on myocardial excitation-contraction coupling. *Pflügers Arch Suppl* 445, S35.

DREINER, U., BOCK, H., DJOUFACK, P. C., FINK, K., GROHÉ, C., MEYER, R. (2004). Influence of estrogen receptor α knockout on myocardial contraction and blood pressure. *Pflügers Arch Suppl* 447, S31.

DREINER, U., FINK, K. B., DJOUFACK, P. C., FAROWSKI, F., MEYER, R., GROHÉ, C.. Influence of gender on cardiac contractility - Role of estrogen receptor α . *Cardio-Vision 2004, Junge Exzellenz in der Kardiovaskulären Forschung*, Verlag Ferdinand Schöningh, Paderborn, 2005, S. 125f.

DREINER, U., FINK, K. B., DJOUFACK, P. C., FAROWSKI, F., GROHÉ, C., MEYER, R. (2005). Gender based differences in cardiovascular phenotype are modulated by oestrogen receptor α signalling. *Pflügers Arch Suppl.* 1, S. 137.

Nicht veröffentlichte Vorträge oder Posterpräsentationen:

DREINER, U., SCHUHMACHER, G. F., WEISSER-THOMAS, J., DJOUFACK, P. C., FINK, K. B., GROHÉ, C., MEYER, R. (2002). Influence of oestrogen receptor α and β knockout on myocardial sarcomere shortening. Meeting of the European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology, Montpellier.

DREINER, U., SCHUHMACHER, G. F., BOCK, H., DJOUFACK, P. C., FINK, K. B., GROHÉ, C., MEYER, R. (2003). The influence of gender and oestrogen receptor alpha knockout on cardiac excitation contraction coupling. Meeting of the European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology, Utrecht.

Veröffentlichungen in der Promotionszeit, deren Ergebnisse nicht in die Dissertationsschrift aufgenommen wurden:

BAUMGARTEN, G., KNUEFERMANN, P., SCHUHMACHER, G., VERVÖLGYI, V., VON RAPPARD, J., **DREINER, U.**, FINK, K., DJOUFACK, C., HOEFT, A., GROHÉ, C., KNOWLTON, A.A., MEYER, R. (2006). Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 25, 43-9.

WEISSER-THOMAS, J., NGUYEN, Q., SCHUETTEL, M., THOMAS, D., **DREINER, U.**, GROHÉ, C., MEYER, R. (2007). Age and hypertrophy related changes in contractile post rest behavior and action potential properties in isolated rat myocytes. *Age* 29, 205-215.

KNUEFERMANN, P., SCHWEDERSKI, M., VELTEN, M., KRINGS, P., STAPEL, H., RÜDIGER, M., BOEHM, O., FINK, K., **DREINER, U.**, GROHÉ, C., HOEFT, A., BAUMGARTEN, G., ZACHAROWSKI, K., MEYER, R. (2008). Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiac myocyte contractility: Role of Toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res.* 78, 26-35.