

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

**Einfluss geschlechts- und östrogenbasierter Signalwege auf  
Titin-Eigenschaften in Rattenherzen und isolierten  
Kardiomyozyten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Julian Alexander Valentin Karpf  
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

FÜR ISABEL

# Zusammenfassung

Das sarkomerische Protein Titin ist eine Hauptdeterminante der passiven Steifigkeit des Myokards und der diastolischen Funktion. Die Titin-basierte passive Steifigkeit von Kardiomyozyten kann durch veränderte Expression der Titin-Isoform oder durch posttranslationale Modifikation, z.B. durch Phosphorylierung der elastischen I-Band-Domänen N2-B und PEVK, moduliert werden. Veränderte Titineigenschaften wurden mit akuten und chronischen Veränderungen der linksventrikulären diastolischen Funktion in Verbindung gebracht, und es wurden geschlechtsabhängige Unterschiede in der diastolischen Funktion bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie vermutet. Ob die Modifikation der Titineigenschaften in einer geschlechtsspezifischen und östrogenabhängigen Weise erfolgt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt. In der hier vorliegenden Dissertation wurde der linke Ventrikel von adulten männlichen, weiblichen und trächtigen weiblichen Ratten (n=3 pro Gruppe) untersucht und die relative Expression von kardialen Titin-Isoformen (N2B, N2BA) mittels SYPRO-Ruby gefärbter Agarose-stabilisierter SDS-PAGE bestimmt. Es konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen festgestellt werden. Western-Blot-Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern zeigten Tendenzen erhöhter Phosphorylierungswerte von PKC  $\alpha$  in Herzen von trächtigen Ratten. Die relative PKC  $\alpha$  -abhängige Phosphorylierung an S11878 und S12022 in der Titin-PEVK-Region war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Allerdings konnten erneut Tendenzen erhöhter Phosphorylierungen von S12022 und S11878 in Herzen trächtiger Ratten verglichen zu männlichen Rattenherzen detektiert werden. Ferner konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der PKA- und ERK1/2-abhängigen Titin-Phosphorylierung an S4010 in der Titin-N2-B-Region beobachten werden. Passive Spannungsmessungen, die an permeabilisierten Kardiomyozyten durchgeführt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse belegen, dass die passiven mechanischen Titin-Eigenschaften in gesunden, adulten Rattenherzen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede aufweisen. Des Weiteren wurde untersucht, ob akut gesteigerte Konzentrationen von Östrogen zu einer Phosphorylierung der elastischen Regionen Titins führen. Hierzu wurden kultivierte adulte Rattenkardiomyozyten für 30 oder 60 Minuten mit Östrogen (10nM oder 100 nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (10nM oder 100 nM) oder einer Kombination aus beiden behandelt und anschließend Titin und relevante Kinasen hinsichtlich ihres Phosphorylierungsstatus mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Signifikante Veränderungen der Kinase-Aktivitäten und der Titin-Phosphorylierung nach singulärer Östrogengabe blieben aus. Im Gegensatz dazu erhöhten die Anwendungen von Fulvestrant allein oder Fulvestrant mit Östrogen bei einer Stimulationsdauer von 60 Minuten und Konzentrationsmenge von 100nM die Werte von P-ERK1/2, P-PKC  $\alpha$  und P-TnI signifikant. Infolgedessen wurde ein Trend zu einer erhöhten Phosphorylierung von PEVK-Titin an S12022 nach kombinierter Gabe von Fulvestrant und Östrogen beobachtet. Es wurde die Hypothese aufgestellt,

dass Fulvestrant die nukleären Östrogenrezeptoren hemmt und die membranständigen G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptoren (GPER30) aktiviert, die die beobachteten akuten Effekte in adulten Kardiomyozyten vermitteln. Diese Hypothese wurde durch Daten aus der Immunhistochemie unterstützt, die zeigten, dass Östrogen, Fulvestrant und die Kombination beider Substanzen eine signifikante Translokation und Fusion von GPER-Vesikeln in die T-Tubulus-Region induzierten. Zusammenfassend wurde aus den Ergebnissen geschlossen, dass die basalen Titin-Eigenschaften nicht signifikant durch das Geschlecht modifiziert werden, dass aber eine akute Veränderung der nicht-genomischen Östrogen-Signalisierung das Potential hat, die Signalwege und Funktionen von Kardiomyozyten schnell zu modulieren.

## Summary

The sarcomeric protein titin is a major determinant of myocardial passive stiffness and diastolic function. Titin-based passive stiffness of cardiomyocytes can be modulated by altered expression of the titin isoform or by posttranslational modification, eg, phosphorylation of the elastic I-band domains N2-B and PEVK. Altered titin properties have been associated with acute and chronic changes in left ventricular diastolic function, and sex-dependent differences in diastolic function have been suggested in patients with hypertrophic cardiomyopathy. However, whether the modification of titin properties occurs in a sex-specific and estrogen-dependent manner remains largely unknown. In the dissertation presented here, the left ventricle of adult male, female, and pregnant female rats (n=3 per group) was examined and the relative expression of cardiac titin isoforms (N2B, N2BA) was determined by SYPRO-Ruby stained agarose-stabilized SDS-PAGE. No significant changes were detected between groups. Western blot analyses with phosphospecific antibodies showed trends of increased phosphorylation levels of PKC $\alpha$  in hearts of pregnant rats. Relative PKC $\alpha$ -dependent phosphorylation at S11878 and S12022 in the titin-PEVK region was not significantly different between groups. However, trends of increased phosphorylations of S12022 and S11878 were again detected in hearts of pregnant rats compared with male rat hearts. Furthermore, no sex-specific differences in PKA- and ERK1/2-dependent titin phosphorylation at S4010 in the titin N2-B region could be observed. Passive voltage measurements performed on permeabilized cardiomyocytes showed no significant differences. These results demonstrate that passive mechanical titin properties in healthy adult rat hearts do not exhibit sex-specific differences. Furthermore, we investigated whether acutely increased concentrations of estrogen lead to phosphorylation of the elastic regions of titin. For this purpose, cultured adult rat cardiomyocytes were treated for 30 or 60 minutes with estrogen (10nM or 100 nM), the estrogen receptor inhibitor fulvestrant (10nM or 100 nM), or a combination of both, and subsequently titin and relevant kinases were examined with respect to their phosphorylation status by Western blot analysis. Significant changes in kinase activities and titin phosphorylation after singular estrogen administration were absent. In contrast, applications of fulvestrant alone or fulvestrant with estrogen significantly increased P-ERK1/2, P-PKC $\alpha$ , and P-TnI levels at a stimulation duration of 60 minutes and concentration level of 100nM. Consequently, a trend toward increased phosphorylation of PEVK-titin at S12022 was observed after combined administration of fulvestrant and estrogen. It was hypothesized that fulvestrant inhibits nuclear estrogen receptors and activates membrane G-protein-coupled estrogen receptors (GPER30), which mediate the observed acute effects in adult cardiomyocytes. This hypothesis was supported by immunohistochemistry data showing that estrogen, fulvestrant, and the combination of both agents induced significant translocation and fusion of GPER vesicles into the t-tubule region. In summary, the results concluded that basal titin properties are not significantly modified by sex but that acute alteration of nongenomic estrogen signaling has the potential to rapidly modulate cardiomyocyte signaling pathways and functions.

# I. Abkürzungsverzeichnis

<b>Name</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>A</b>	Amper
<b>A-Band</b>	Anisotropes Band
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylylzyklase
<b>AKT</b>	Proteinkinase B
<b>AMPK</b>	Adenosintriphosphat-abhängige Proteinkinase
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ARCM</b>	Adulte Rattenkardiomyozyten
<b>ARVC</b>	arrhythmogene rechtsventrikulären CM
<b>AUC</b>	<i>area under the curve</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>C°</b>	Grad Celsius
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalzium
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>CAD</b>	Koronare Herzerkrankung
<b>CaMK II delta</b>	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta
<b>cAMP</b>	Zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	Zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CM</b>	Kardiomyopathie
<b>CM</b>	Kardiomyozyt
<b>c-TnI</b>	Kardiales Troponin I
<b>c-TnT</b>	Kardiales Troponin T
<b>CTRL</b>	Kontrolle
<b>CUT</b>	Schneidelösung
<b>CVD</b>	Herz-Kreislauf-Erkrankung
<b>CVSD</b>	Zerebrovaskuläre Erkrankung
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCM</b>	Dilatative Kardiomyopathie
<b>DCP</b>	Verdau-Kollagenase-Protease Puffer
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E1</b>	Östron
<b>E2</b>	17β-Östradiol
<b>E3</b>	Östriol
<b>ECL</b>	signalverstärkte Chemolumineszenz

<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Östrogenrezeptor alpha
<b>ER<math>\beta</math></b>	Östrogenrezeptor beta
<b>ERE</b>	<i>Estrogen-response-element</i>
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>et al.</b>	et alii (lat. und andere)
<b>Fulv</b>	Fulvestrant
<b>FBS</b>	fetales Kälberserum
<b>FN</b>	Fibronectin
<b>g</b>	Gramm
<b>Gi</b>	inhibitorischen G-Protein
<b>G1</b>	Selektiver GPER30 Agonist
<b>GPCR</b>	G-Protein gekoppelter Rezeptor
<b>GPER30</b>	G-Protein gekoppelter Östrogenrezeptor 30
<b>G<sub>s</sub></b>	stimulatorisches G-Protein
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sup>+</sup></b>	Wasserstoff
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff
<b>HCM</b>	hypertrophe Kardiomyopathie
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Hydrogencarbonat
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b><i>HFpEF</i></b>	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
<b><i>HFrfEF</i></b>	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase
<b>HSP</b>	Hitzeschockproteine
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>I-Band</b>	isotropes Band
<b>I.E.</b>	internationale Einheiten
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>I/R</b>	Ischämie/Reperfusion
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Liter
<b>L<sub>p</sub></b>	Persistenzlänge
<b>LV</b>	linksventrikulär
<b>mA</b>	Milliampere

<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
<b>M-Band</b>	Mittel-Band
<b>MDa</b>	Megadalton
<b>MEK</b>	Kinase der Mitogen-aktivierten Proteinkinase
<b>Met</b>	Metformin
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl</b>	Magnesiumchlorid
<b>MI</b>	Myokardinfarkt
<b>min</b>	Minute
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>MyBP-C</b>	Myosin-bindendes-Protein C
<b>N2-Bus</b>	<i>N2-B unique sequence</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Natriumdihydrogenphosphat
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>nm</b>	Nanometer
<b>P</b>	Phosphorylierung
<b>PAD</b>	peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PEVK</b>	Prolin Glutaminsäure Valin Lysin
<b>PDE</b>	Phosphodiesterasen
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pg</b>	Picogramm
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	Ca <sup>2+</sup> -abhängigen Proteinkinase C $\alpha$
<b>PKG</b>	cGMP-abhängigen Proteinkinase
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PP1</b>	Proteinphosphatase 1
<b>PP2</b>	Proteinphosphatase 2
<b>PP5</b>	Proteinphosphatase 5
<b>PR</b>	Progesteronrezeptor

<b>PT</b>	Passive Spannung
<b>PTM</b>	Posttranslationale Modifikation
<b>PVDF</b>	Polyvinylendifluorid
<b>Raf</b>	Ratte-Fibrosarkom-Protein
<b>RAS</b>	Renin-Angiotensin-System
<b>RBM20</b>	RNA-bindendes Protein 20
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>RVLM</b>	rostrale ventrale laterale Medulla
<b>S</b>	Serin
<b>s</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>SERCA</b>	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
<b>SM</b>	<i>Second messenger</i>
<b>SNP</b>	Einzelnukleotid-Polymorphismus
<b>SR</b>	sarkoplasmatischen Retikulums
<b>T</b>	Threonin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBST</b>	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (mit 0,1% Tween)
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TK</b>	Titinkinase
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>T3</b>	Schilddrüsenhormon
<b>U/ml</b>	Units pro Milliliter
<b>us</b>	<i>unique sequence</i>
<b>V</b>	Volt
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>17β-HSD</b>	17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentuale Verteilung der Todesursachen nach Krankheitsarten 2018 in Deutschland. ....	2
Abbildung 2: Östrogen Metabolismus (Monteiro et al. 2014). ....	4
Abbildung 3: Wirkmechanismus von Östrogen (E2) und Fulvestrant (Fulv) über Östrogenrezeptoren (ERs) in der Herzmuskelzelle. ....	9
Abbildung 4: Darstellung des Sarkomers im quergestreiften Muskel (modifiziert nach Ottenheim et al., 2011). ....	10
Abbildung 5: Darstellung der Titinstruktur in einem kardialen Halbsarkomer (modifiziert nach Koser et al., 2019). ....	11
Abbildung 6: Ruhedehnungskurve einer Herzmuskelzelle (modifiziert nach Koser et al., 2019). ....	12
Abbildung 7: Titin als entropische Feder im Halbsarkomer (Linke und Grützner, 2008). ....	13
Abbildung 8: Veränderung der passiven Kraftentwicklung in Kardiomyozyten aufgrund des Isoformenswitches (modifiziert nach Fukada et al., 2010). ....	14
Abbildung 9: Regulationsmechanismen der kardialen Titin – Isoformen Expression (modifiziert nach Linke und Hamdani, 2014). ....	15
Abbildung 10: Darstellung beteiligter Proteinkinasen an den posttranslationalen Modifikationen des elastischen I-Band Titins und deren Auswirkung auf die myokardiale Steifigkeit (modifiziert nach Koser et al., 2019). ....	17
Abbildung 11: Proteinkinasen und ihre Phosphorylierungsstellen innerhalb der N2Bus und PEVK von kardialem Titin (modifiziert nach Linke und Hamdani, 2014). ....	18
Abbildung 12: Kardiale Titin-Eigenschaften bei männlichen, weiblichen und trächtigen Ratten. ....	37
Abbildung 13: Relative Titin-Domänen und Proteinkinase-Phosphorylierung in LV von weiblichen und trächtigen Rattenherzen im Vergleich zu männlichen Kontrollen. ....	39
Abbildung 14: Korrelationsanalyse der relativen Titin-Phosphorylierungen und Kinase-Aktivitäten in linksventrikulärem (LV) Gewebe weiblicher und trächtiger Ratten mit den einzelnen Serumöstrogenwerten. ....	40
Abbildung 15: Korrelationsanalyse der relativen Titin-Phosphorylierungen und Kinase-Aktivitäten in linksventrikulärem (LV) Gewebe weiblicher und trächtiger Ratten mit den einzelnen Serumprogesteronwerten. ....	41

Abbildung 16: Analyse der Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit (Met, 10 nM) oder ohne (Ctrl = Kontrolle) Metformin. für 1h... ..	<b>42</b>
Abbildung 17: Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung und Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Östrogen (E2, 10nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (Fulv, 10nM) oder isotonischem Puffer (Ctrl = Kontrolle) für 1h.....	<b>44</b>
Abbildung 18: Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung und Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Östrogen (E2, 100nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (Fulv, 100nM) oder isotonischem Puffer (Ctrl = Kontrolle) für 1h.....	<b>45</b>
Abbildung 19: Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung und Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Östrogen (E2, 100 nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (Fulv, 100 nM) oder isotonischem Puffer (Ctrl = Kontrolle) für 30min. ....	<b>47</b>
Abbildung 20: Lokalisierung von GPER30 im Kardiomyozyten. ....	<b>48</b>
Abbildung 21: Bestimmung der Signalintensität und Signalverteilung von anti-GPER30 gefärbten kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten mit und ohne Östrogenbehandlung.....	<b>49</b>

### **III. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Chemikalien .....	<b>20</b>
Tab. 2: Laborgeräte.....	<b>21</b>
Tab. 3: Puffer und Lösungen.....	<b>22</b>
Tab. 4: Zellkulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten .....	<b>24</b>
Tab. 5: Antikörper.....	<b>24</b>
Tab. 6: Titinantikörper .....	<b>25</b>
Tab. 7: Stimulanzen .....	<b>25</b>
Tab. 8: Komponenten des Standard SDS – Gels: Angaben für 4 Minigele .....	<b>31</b>
Tab. 9: Komponenten des Titingels: Angabe für 2 Minigele .....	<b>31</b>
Tab. 10: Sexualhormonbestimmung von 17 $\beta$ -Östradiol und Progesteron in adulten Ratten .....	<b>36</b>

# IV. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen .	1
1.2 Östrogen .....	3
1.2.1 Synthese und Funktion .....	3
1.2.2 Zirkulierendes Östrogen .....	5
1.2.3 Kardiales Östrogen .....	5
1.2.4 Kardiale Östrogenrezeptoren .....	5
1.2.4.1 Nukleäre Östrogenrezeptoren .....	5
1.2.4.2 Nicht-nukleäre Östrogenrezeptoren .....	6
1.2.5 Signalwege von Östrogen .....	6
1.2.5.1 Östrogenabhängiger nukleär initiiertes Signalweg.....	7
1.2.5.2 Östrogenabhängiger membraninitiiertes Signalweg .....	7
1.2.5.3 Östrogenunabhängiger Signalweg .....	8
1.2.5.4 Ligandenunabhängige Aktivierung von Östrogenrezeptoren .....	8
1.3 Titin .....	9
1.3.1 Aufbau und Struktur .....	10
1.3.2 Titin-abhängige passive Steifigkeit der Muskeln .....	11
1.3.3 Modulation der passiven Steifigkeit.....	13
1.3.3.1 Veränderungen der Isoformenverhältnisse .....	13
1.3.3.2 Posttranslationale Modifikation des elastischen I-Band Segments .....	16
1.4 Fragestellung .....	19
1.5 Lizenzen für Abbildungen.....	19
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Material .....	20
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 Laborgeräte .....	21
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	22
2.1.4 Zellkulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten .....	24
2.1.5 Antikörper .....	24
2.1.6 Stimulanzen .....	25
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Tötung zur Organentnahme .....	26
2.2.2 Geschlechtsspezifische Gewebeaufarbeitung .....	26
2.2.3 Solubilisieren und Proteinkonzentrationsbestimmung .....	26
2.2.3.1 Solubilisieren .....	26
2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford – Photometer .....	27
2.3.4 Präparation, Kultivierung, Stimulations- und Inhibitionstests adulter Rattenkardiomyozyten .....	27
2.3.4.1 Präparation.....	27

2.3.4.2 Kultivierung.....	28
2.3.4.3 Stimulationstests .....	28
2.3.5 Nachweis östrogenabhängiger Signalwege, deren Einfluss auf die Titinphosphorylierung und das Titinisoformenverhältnis .....	29
2.3.5.1 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE).....	29
2.3.5.3 Western Blot.....	32
2.3.5.4 Visualisierung von Titin .....	33
2.3.5.4.1 Visualisierung von Titin mittels Imperial Protein Stain.....	33
2.3.5.4.2 Visualisierung von Titin mittels Sypro Ruby .....	34
2.3.6 Visualisierung des GPER30-Rezeptors in adulten männlichen Rattenkardiomyozyten .....	34
2.3.7 Analyse der Pixelintensität des GPER30 Rezeptors.....	35
2.3.8 Software .....	35
2.3.9 Statistische Datenanalyse.....	35
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1 Sexualhormonbestimmung in adulten Ratten .....	36
3.2 Gewebeanalyse des linken Ventrikels .....	37
3.2.1 Geschlechtsspezifische Titinisoformenzusammensetzung .....	37
3.2.2 Geschlechtsspezifische Veränderungen der Phosphorylierung von elastischen Titindomänen und Kinaseaktivitäten .....	38
3.2.3 Geschlechtsspezifische Korrelation der Östrogen Serumspiegel mit den relativen Titinphosphorylierungen und Kinaseaktivitäten.....	39
3.2.4 Geschlechtsspezifische Korrelation der Progesteron Serumspiegel mit den relativen Titinphosphorylierungen und Kinaseaktivitäten.....	40
3.3 Hormonstimulationstests .....	41
3.3.1 Nachweis der Aktivierung der PKC $\alpha$ - und ERK1/2 Kinaseaktivitäten mittels Positivkontrolle Metformin .....	41
3.3.2 Keine statistisch signifikanten Veränderungen der I-Band Titinphosphorylierung und daran beteiligten Kinasen nach Östrogenstimulation.....	42
3.3.2.1 Ausbleibender Östrogeninduzierter Effekt auf die Titinphosphorylierungen und Kinaseaktivitäten bei geringer Stimulationsmenge.....	43
3.3.2.2 Verstärkung der schnellen nicht-genomischen GPER30-vermittelten Signaltransduktion durch Östrogen-Rezeptor-Hemmung mit Fulvestrant.....	44
3.3.2.3 Verstärkung der östrogeninduzierten schnellen nicht-genomischen GPER30-Effekte bei reduzierter Stimulationsdauer.....	46
3.3.3 Translokation von GPER30-Vesikeln in die Z-Scheiben Region von kultivierten adulten Rattenkardiomyozyten .....	47
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>50</b>
4.1 Unveränderte geschlechtsspezifische Titin-Isoformenzusammensetzung in adulten Ratten .....	50
4.2 Ausbleiben geschlechtsspezifischer akuter Modifikation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit.....	52

4.3 Vergleich der Korrelationsergebnisse von Östrogen und Progesteron mit den Einzelwerten relativer Phosphorylierungen der Titin-I-Band Modifikationen und Proteinkinasen.....	53
4.4 Limitationen der Korrelationsergebnisse.....	57
4.5 Rolle des GPER30 im Herzen.....	58
4.6 Translokation des GPER30 in das transversale Tubulussystem nach Hormongabe.....	59
4.7 Bestätigung des Ansprechens der zu untersuchenden Signalwege durch das Antidiabetikum Metformin .....	61
4.8 Fehlender signifikanter Effekt niedriger physiologischer Östrogenkonzentrationen auf die Titin-I-Band-Phosphorylierung und Kinaseaktivitäten .....	61
4.9 Agonistische Effekte von Fulvestrant bei fehlendem Effekt hoher physiologischer Östrogenkonzentrationen auf die Titin-I-Band-Phosphorylierung und Kinaseaktivitäten .....	64
4.10 Aktivitätszunahme Östrogen-induzierter Signalwege bei reduzierter Stimulationsdauer.....	66
4.11 Zusammenfassung der Stimulationsversuche und Ausblick.....	68
<b>5. Schlussfolgerung .....</b>	<b>70</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>77</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>80</b>

# 1. Einleitung

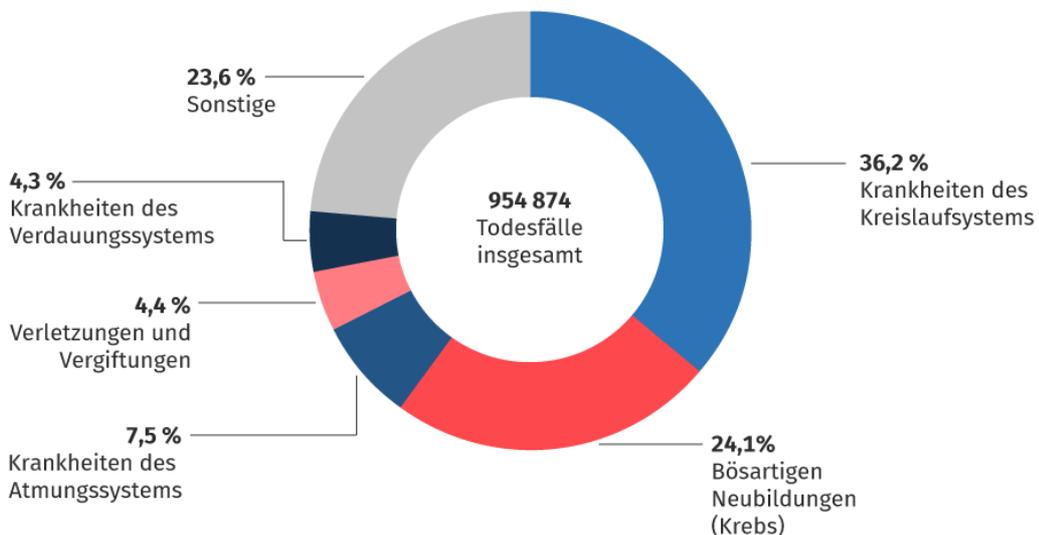
## 1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Das Herz-Kreislauf-System besteht aus dem Herz und den Blutgefäßen (1). Kardiometabolische Erkrankungen wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen und Adipositas sowie gesundheitsbeeinträchtigende Lebensstile wie Rauchen, körperliche Inaktivität und ungesunde Ernährung führen zu pathologischen Veränderungen innerhalb des Systems (2, 3). Pathophysiologisches Korrelat der Veränderungen sind die Bildung von atherosklerotischen Plaques in den arteriellen Gefäßen des Herz-Kreislauf-Systems. Der entzündliche, pathogene Prozess kann als Folge eines verminderten oder fehlenden Blutflusses infolge der Verengung der Blutgefäße das Herz-Kreislauf-Systems mehrbelasten, was die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD) begünstigt. Zu den Hauptdeterminanten der CVDs zählen unter anderem die koronaren Herzkrankheiten (CAD), zerebrovaskulären Erkrankungen (CVSD), peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten (PAD) und sklerotischen Veränderungen der Aorta (1).

Die CVDs stellen bedeutsame gesundheitliche Risikofaktoren dar und sind weltweit eine der Hauptursachen eines frühzeitigen Todes (4, 5). In Amerika sind die CVDs bei fast 60% der amerikanischen Erwachsenen die Haupttodesursache (2). Auch in der europäischen Region werden die CVDs sowohl bei Männern als auch bei Frauen zu den häufigsten Todesursachen gezählt, die für 46% aller Todesfälle in Europa verantwortlich sind. 20% aller Todesfälle sind auf CADs, gefolgt von 12% durch Schlaganfälle zurückzuführen. Besonders die durch CADs entstehenden CVDs sind für die vorzeitige Mortalität ursächlich. Daten aus 2013 zeigten in Europa fast 1,5 Millionen Todesfälle vor dem 75. Lebensjahr, darunter über 710 000 Todesfälle von Europäern im Alter von unter 65 Jahren. Fast die Hälfte dieser Todesfälle war allein auf CADs zurückzuführen (6). Untersuchungen des Statistischen Bundesamtes von 2015 führten CVDs ebenfalls als häufigste Todesursache bei Männern und Frauen in Deutschland auf. Deren Anteil an den gesamten Todesursachen lag bei 38,5%. Den Ergebnissen der aufgeführten kardiovaskulären Studien entsprechend zeigte sich als wichtigste spezifische Todesursachengruppe erneut die der CADs (7).

## Todesursachen nach Krankheitsarten 2018

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020

**Abbildung 1: Prozentuale Verteilung der Todesursachen nach Krankheitsarten 2018 in Deutschland.** 954874 Todesfälle wurden für das Jahr 2018 durch das Statistische Bundesamt ermittelt. Krankheiten des kardiovaskulären Systems waren für 36,2% aller Todesfälle verantwortlich. Damit führen Krankheiten des Kreislaufsystems die Statistik der Todesursachen an. (Statistisches Bundesamt, 2020).

Obwohl CVDs bei beiden Geschlechtern die Haupttodesursache darstellen, weisen Frauen eine erniedrigte Inzidenzrate der CVDs im Vergleich zu Männern auf (8). Deutlich wird der kardiovaskulär-protective Effekt bei prämenopausalen Frauen verglichen mit gleichaltrigen Männern. Die Frauen erkranken aufgrund eines niedrigen Blutdrucks sowie eines geringeren Risikos seltener an CVDs als Männer. Der Vorteil für Frauen verschwindet jedoch mit dem Einsetzen der Menopause. Durch das Stagnieren der Eierstockfunktion mit konsekutiver Senkung des Östrogenspiegels steigt das Risiko zur Entwicklung von CVDs über das von gleichaltrigen Männern (9). Die höhere Lebenserwartung bei Frauen im Vergleich zu Männern trotz höherer Mortalitätsraten bei akuten kardiovaskulären Ereignissen liegt unter anderem an der geschlechtsspezifischen Entwicklung von Subtypen der Hauptdeterminanten der CVDs. Während Männer eher eine durch atherosklerotische Plaques bedingte okklusive CAD entwickeln, leiden Frauen häufiger an einer nicht-obstruktiven CAD. Durch die schwerere Atherosklerose in den Koronararterien tritt der Myokardinfarkt (MI) im Allgemeinen 10 Jahre früher auf und ist bei Männern mit einer weiter verbreiteten Lokalisation der CAD verbunden als bei Frauen. Der Schutz von prämenopausalen Frauen vor Entwicklung einer Atherosklerose ist noch nicht ausreichend geklärt. Unter anderem werden die Sexualhormone mit dem protektiven Effekt in Verbindung gebracht. Frauen mit hormonellen Störungen, wie z.B. dem polyzystischen Ovarialsyndrom, erkranken früher an

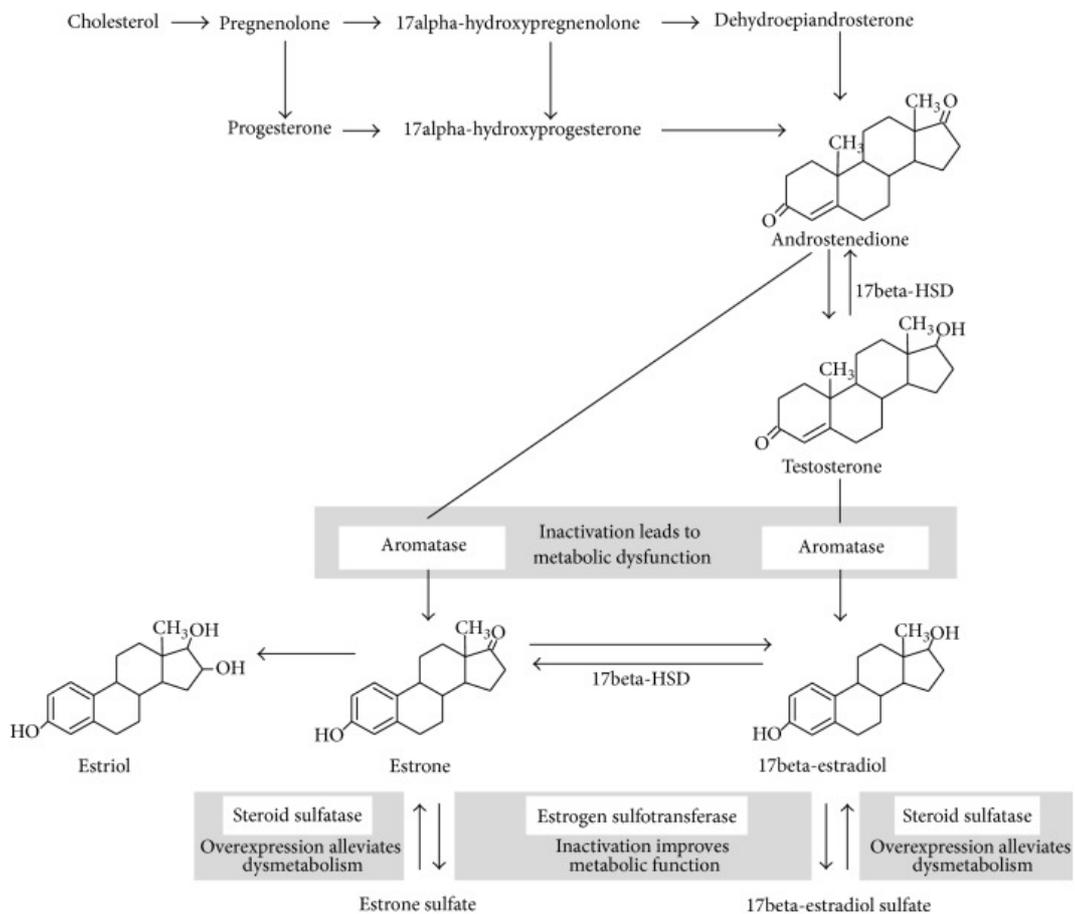
Atherosklerose und MI als gesunde Frauen. Selbst Männer mit einer störenden Östrogenrezeptor (ER)  $\alpha$  (ESR1)-Mutation entwickeln eine frühe KHK, was die Rolle von Östrogen und seines Rezeptors (ER) unterstreicht (10). In Tiermodellen konnte der protektive Effekt weiblicher Sexualhormone ebenfalls belegt werden. Weibliche Jungtiere zeigten eine geringere Rate an Gefäßverletzungen, ein langsames Fortschreiten zur Herzinsuffizienz und eine geringere Mortalität als männliche. Diese Unterschiede konnten durch Östrogenmangel oder Ovariectomie verringert oder beseitigt werden (9). Auch das Vorkommen von Kardiomyopathien (CM) variiert geschlechterspezifisch. Obwohl eine zunehmende Anzahl von Kardiomyopathien eine genetische Grundlage haben, sind einzelne Mutationen mit phänotypischer Variabilität verbunden und können nicht nur eine bestimmte CM, sondern auch mehrere verschiedene CMs verursachen. Neue Studien verweisen neben Umweltinteraktionen vor allem auf das Alter und Geschlecht, das die Penetranz von Krankheitsgenen beeinflussen und damit die phänotypische Expression von CMs bestimmen können. Neben dem Geschlecht scheinen auch Sexualhormone, die große intergeschlechtliche Hormonlevelunterschiede aufweisen, tiefgreifende Auswirkungen auf die Prävalenz und den Schweregrad von CMs zu haben. Das Verhältnis zwischen Östrogen und Testosteron scheint die geringere Prävalenz von CVDs in der prämenopausalen Phase zu erklären. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Prävalenz, den Phänotypen und dem klinischen Verlauf werden beispielhaft für die arrhythmogene rechtsventrikuläre CM (ARVC) beschrieben. Sie ist bei Männern stärker verbreitet als bei Frauen, wobei das Verhältnis etwa 3:1 beträgt (11).

## 1.2 Östrogen

### 1.2.1 Synthese und Funktion

Östrogene sind neben Progesteron und Testosteron eine Gruppe von Sexualsteroiden, die auf mehrere Organe eine pleiotrope Wirkung ausüben. Der Effekt geht über den Rahmen ihrer reproduktiven Funktion hinaus (12). Es werden Auswirkungen des Östrogens auf verschiedene Systeme, wie Fett-, Nerven-, Herz-Kreislauf-, Muskel- und Knochengewebe beschrieben, wodurch diese Hormone in vielen verschiedenen physiologischen Rollen verwickelt sind (13). Die Sexualsteroidsynthese findet sowohl bei der Frau als auch bei dem Mann statt und unterliegt dem hypothalamisch-hypophysären System (13, 14). Über die Freisetzung von hypothalamischen Releasing- und adenohipophysären glandotropen Hormonen stehen die zentralnervösen Zentren mit dem peripheren Zielgewebe der Gonaden und den Nebennierenrinden, als Orte der Östrogensynthese in Verbindung (13, 15). Die Hauptquelle für Östrogene bei prämenopausalen Frauen sind die Eierstöcke, der Gelbkörper und die Plazenta. Beim Mann werden Östrogene vor allem in dem Hoden und der Prostata synthetisiert. Daneben können Östrogene extragonadal produziert werden, darunter in der Nebennierenrinde, Herzen, Knochen, Brust, Fettgewebe und dem Gehirn (9, 12). Im endoplasmatischen Retikulum östrogenproduzierender Zellen befindet sich das Enzym Cytochrom p450-Aromatase, welches die Aromatisierung von den männlichen Sexualhormonen Testosteron und

Androstendion zu 17  $\beta$  -Östradiol (E2), dem aktivsten Östrogen, und Östron (E1) katalysiert. Die Keimdrüsen und Nebennierenrinden als primäre Zielorte des hypothalamisch-hypophysären Systems exprimieren alle notwendigen Enzyme zur Synthese von Östrogenen aus Cholesterin, während die anderen extragonadalen Gewebearten, wie der Knochen oder das Fettgewebe, auf die Versorgung mit Vorläufern aus diesen Organen durch das Blut angewiesen sind. In den peripheren Geweben wandelt die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) die schwächeren Vorläuferhormone, Androstendion und Östron, in die stärkeren Hormone, Testosteron und 17 $\beta$ -Östradiol, um (13). Die lokale Produktion, Umwandlung sowie der Abbau von Steroiden ist ein zentraler Prozess der gewebespezifischen, intrazellulären Feinregulation der hormonellen Wirkung. Veränderungen in der lokalen Aktivierung oder Inaktivierung der Steroidhormone einschließlich der Sexualsteroidhormone tritt während der Embryonalentwicklung, der Vorgänge des Alterungsprozesses, der Tumorgenese und der Anpassung des Organismus an verschiedene pathophysiologische Zustände auf (12, 14).



**Abbildung 2: Östrogen Metabolismus (Monteiro et al. 2014).** Darstellung des Synthesewegs der weiblichen Sexualhormone Östradiol (17 $\beta$ -Östradiol), Östron und Östriol aus Cholesterin (13).

## 1.2.2 Zirkulierendes Östrogen

Drei natürlich vorkommenden Östrogene, die im Herz-Kreislauf-System des Menschen zirkulieren, sind Östron (E1), 17 $\beta$ -Östradiol (E2) und Östriol (E3). E2 ist das Östrogen mit der stärksten Potenz. Die Sekretion von E2 ist pulsatil und seine Konzentration schwankt innerhalb eines Menstruationszyklus (100 - 600 pg/ml). Während der Schwangerschaft steigt sie bis auf 17000 pg/ml an. Nach der Menopause sinkt die E2-Konzentration im Serum rasch auf ähnliche oder niedrigere Werte wie bei Männern ähnlichen Alters (5 - 20 pg/ml) (12).

## 1.2.3 Kardiales Östrogen

Für die lokale Östrogenbiosynthese ist die Cytochrom-P450-Aromatase (CYP19A1) erforderlich. Durch Aromatisierung wird Androstendion und Testosteron zu ihren jeweiligen Östrogenen metabolisiert. Studien weisen die Enzymaktivität der P450-Aromatase in verschiedenen extragonadalen Geweben nach. Ihre Transkriptionsspleißung erweist sich als gewebsspezifisch. Dies deutet stark auf eine organabhängige Transkriptionsregulation der Aromatase hin. Neue Daten belegen, dass die Aromatase auch im Herzen exprimiert wird, was für eine lokale kardiale Östrogenproduktion spricht. Angesichts der Beziehung zwischen Sexualhormonen und Aromataseexpression in situ und der Assoziation von Aromatasepolymorphismen mit dem einhergehenden Risiko von CVDs wird der funktionelle Zusammenhang zwischen lokaler E2-Aktivität und kardialer Aromatase bei E2-vermittelter Kardioprotektion deutlich (12, 13).

## 1.2.4 Kardiale Östrogenrezeptoren

Östrogen vermittelt seine pleiotropen Effekte über seine spezifischen Östrogenrezeptoren (ER). Diese werden in 2 Gruppen eingeteilt: Die nukleären ERs, die sowohl im Zytosol als auch in der Plasmamembran lokalisiert sind und die nicht-nukleären ERs, die überwiegend membranständig vorkommen (12, 16, 17).

### 1.2.4.1 Nukleäre Östrogenrezeptoren

Innerhalb der Gruppe der länger bekannten klassischen nukleären ERs sind bis heute 2 Subtypen identifiziert worden: der ER $\alpha$  und ER $\beta$  (16). Diese werden durch die Gene ESR1 beziehungsweise ESR2 kodiert. Das Vorkommen der ER-Subtypen wird intrazellulär im Zytosol, in den Mitochondrien und in der Plasmamembran beschrieben (12). Beide Subtypen tragen ähnliche strukturelle Domänen, unterscheiden sich jedoch in ihren DNA- und Ligandenbindungsregionen, die für ihre vielfältigen Transkriptionsaktivitäten von entscheidender Bedeutung sind (18). Die nukleären ER-Subtypen werden in verschiedenen Gewebetypen, zusätzlich zu den Gonaden, weitläufig exprimiert. Gewebesanalysen ergaben den Nachweis von ER $\alpha$  und ER $\beta$  in den Herzen von Erwachsenen und Neugeborenen. Zusätzlich konnte die Expression beider nukleärer ER-Subtypen im Vorhof- und Kammermyokard weiblicher und männlicher Mäuse nachgewiesen werden (12).

Neuere Beobachtungen zeigten allerdings, dass nur ER  $\alpha$ , nicht aber ER  $\beta$ , in linksventrikulärem Herzgewebe von Mäusen und isolierten Rattenkardiomyozyten (RCM) exprimiert wird (18). In isolierten RCMs wurden ähnliche Level an exprimiertem ER $\alpha$  bei den Geschlechtern gefunden (19). Funktionell bedeutsamer für das Herz ist eher der ER $\alpha$ . ER $\beta$  scheint vor allem eine wichtige neuroprotektive Rolle im zentralen Nervensystem zu spielen. Das Expressionsverhältnis von ER $\alpha$ /ER $\beta$  wirkt sich auf das kardiovaskuläre System aus. So konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes Verhältnis von ER $\beta$ /ER $\alpha$  sowohl im vaskulären Endothel als auch in der glatten Muskulatur bei gealterten weiblichen Mäusen die Umkehrung der antioxidativen Wirkung von Östrogen zu einem prooxidativen Profil verursacht und für den erhöhten oxidativen Stress während des Alterns verantwortlich ist (9). Zudem zeigten Studien, dass Mutationen in den Genen, die für ER $\alpha$  und ER $\beta$  kodieren, mit Unterschieden in der Herzmorphologie und Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System verbunden sind (12, 18). Auch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in sowohl ER $\alpha$  als auch in ER $\beta$  waren mit der Anfälligkeit für CVDs assoziiert (18). Die kardialen nukleären ERs sind funktionell aktiv und regulieren die Genexpression und posttranslationalen Veränderungen durch langsame genomische und schnelle nicht-genomische Signalwege. Die ERs üben anti-apoptotische, pro-hypertrophische, anti-inflammatorische, anti-atherosklerotische, gefäßerweiternde und angiogene Effekte im kardiovaskulären System aus (12).

#### **1.2.4.2 Nicht-nukleäre Östrogenrezeptoren**

Darüber hinaus berichteten Studien von einem neuen, dritten, in der Plasmamembran und endoplasmatischem Retikulum lokalisierten G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptor (GPER30) (20). Der GPER30 gehört zu der Familie der 7-Transmembran-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und weicht von der Struktur der nukleären ERs ab. Die Bindungsaffinität für GPER30 stellte einen 10-fach höheren Wert dar als der für ER $\alpha$  ermittelte (17). Sowohl im männlichen als auch im weiblichen Herzgewebe von Menschen und Ratten wird der GPER30 stark exprimiert. Insbesondere kommt der GPER in glatten Muskelzellen, Endothelzellen, kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten vor (18). Analysen von kardialem Gewebe zeigten ähnliche Werte an GPER30-Leveln bei männlichen und weiblichen Ratten (21). Funktionell wird dem GPER30 die Vermittlung sowohl schneller als auch transkriptioneller Ereignisse als Reaktion auf Östrogen zugeschrieben (17). Besonders unter ischämischem und hypertensivem Stress hat sich der GPER30 als kardioprotektiv erwiesen, indem kardialer Zelltod über Reduzierung von Nekrose und Apoptose entgegenwirkt wird (12, 21, 22).

#### **1.2.5 Signalwege von Östrogen**

Die physiologischen Wirkungen von Östrogen werden vorwiegend über die jeweiligen ERs vermittelt. Je nachdem, ob das Endergebnis der ER-Signalisierung die Transkriptionsregulation von östrogenabhängigen Zielgenen ist oder nicht, werden die Signalwege in genomische und nicht-genomische Signalwege eingeteilt (9, 18). Östrogenabhängige Pfade werden entsprechend der

Lokalisation der ERs an der Membran, im Zytosol oder im Zellkern initiiert (9, 16). Neben den ER-abhängigen Signalwegen sind auch ER-unabhängige Signalwege beschrieben worden. Östrogen bindet nicht an ERs, sondern initiiert die ER-unabhängigen Signalwege durch die Regulierung enzymatischer Aktivitäten oder durch die Interaktion mit nicht-Sexualsteroid-Hormon-Kernrezeptoren in bestimmten Zellen. Insgesamt werden 4 Hauptsignalwege im Zusammenhang mit Östrogen beschrieben: der östrogenabhängige nukleär initiierte-, der östrogenabhängige membraninitiierte-, der östrogenunabhängige Signalweg und die ligandenunabhängige Aktivierung von ERs (9) (Abb. 3).

### **1.2.5.1 Östrogenabhängiger nukleär initiiertes Signalweg**

In dem als klassisch bezeichneten Signalweg findet die Bindung von Östrogen an die nukleären ERs statt. Die Bindung löst die Dissoziation von Hitzeschockproteinen (HSP90) aus dem ER aus. Es folgt eine Homo- oder Heterodimerisierung der ER mit darauffolgender Translokation vom Plasma in den Kern. Der Östrogen-ER-Dimerkomplex bindet intranukleär direkt an spezifische DNA-Sequenzen, die Östrogen-Response-Elemente (EREs), die in den regulatorischen Regionen der östrogensensitiven Gene liegen. Alternativ kann Östrogen an ERs, die schon an die ERE gebunden sind, binden (16, 18). Der sogenannte gebundene Signalweg stellt eine Unterform des klassischen nukleären Östrogensignalweges dar. Dieser umfasst nach der Ligandenaktivierung durch Östrogen die Protein-Protein-Interaktion mit anderen Proteinkinasen, z.B. die mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 und -p38 (ERK1/2-MAPK, p38-MAPK) sowie die phosphoinositidische 3-Kinase-Serin/Threonin-spezifische Kinase B (PI3K/AKT), die ihrerseits ERs oder promotorgebundenen Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, und beeinflusst so die Genregulation durch indirekte DNA-Bindung (18, 23). Zusätzlich zu dem klassischen ER Signalweg werden sogenannte „Crosstalks“ mit Wachstumsfaktor- und G-Protein-gekoppelten Signalwegen beschrieben. So kann Östrogen über ERs-gekoppelte-Transaktivierung Wachstumsfaktor-Rezeptoren (GF), wie den epidermalen Wachstumsfaktor- (EGF-) Rezeptor und den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2/neu) aktivieren (16, 21).

### **1.2.5.2 Östrogenabhängiger membraninitiiertes Signalweg**

Ein alternativer östrogenabhängiger Mechanismus ist der schnelle membraninitiierte Weg, bei dem die östrogeninduzierte Signalübertragung in der Membran oder im Zytoplasma initiiert wird, und die nachgeschalteten Effekte nur teilweise von der Translation oder Transkription abhängig sind (9). Östrogen aktiviert direkt die membran- und/ oder plasmaassoziierten ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  und GPER30, die über eine schnelle Signaltransduktion sogenannte „second messenger (SM)“ aktivieren. Protein-Signalkaskaden, wie MAPK/ERK, PI3K/AKT, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und die Tyrosinkinase-Wege aktivieren wiederum die nachgeschaltete Gentranskription über Ko-Aktivatoren und Transkriptionsfaktoren (9, 12). Auch nicht-genomische Effekte können durch Aktivierung dieser Signaltransduktionskaskaden vermittelt

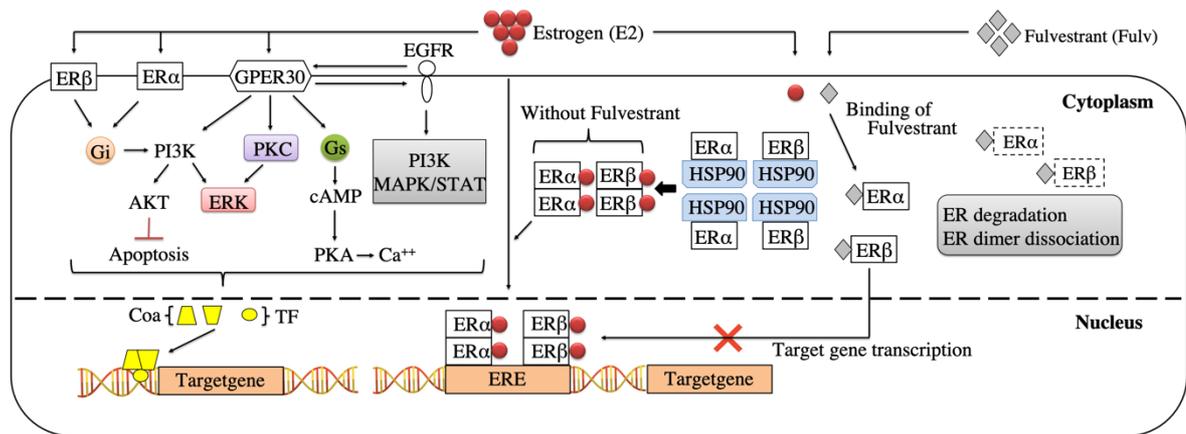
werden (18). Über die SM wird die Aktivität von Ionenkanälen verändert. Dies führt zu schnellen intrazellulären Veränderungen ohne Einflussnahme auf die Genregulation (23). Am Beispiel des GPER30 wird die schnelle Aktivierung mehrerer Signalkaskaden als Reaktion auf Östrogen vermittelt, wie der PI3K- und Kalzium-Signalisierung (9). Zusätzlich aktiviert Östrogen in den Mitochondrien lokalisierte ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  und nimmt an der Regulation der mitochondrialen Funktion und zellulären Energiehomöostase teil (12).

### **1.2.5.3 Östrogenunabhängiger Signalweg**

Im östrogenunabhängigen Signalweg kann Östrogen enzymatische Aktivitäten regulieren oder mit nicht-sexuellen Steroid-Hormon-Nuklearrezeptoren interagieren. Der östrogenunabhängige Signalweg spielt in der antioxidativen Wirkung der Östrogene eine wichtige Rolle, indem intrazellulär entstehender oxidativer Stress unterdrückt wird, um vor Zellschäden zu schützen. Die antioxidative Wirkung von Östrogenen ist auf den phenolischen A-Ring der Östrogene zurückzuführen, der als intrinsisches Antioxidans wirkt. Die Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) aus geschädigten Mitochondrien kann unabhängig von bekannten ER-Signalwegen verhindert werden. Im vaskulären Kompartiment scheint Östrogen über nicht-sexuale Hormon-Nukleäre Rezeptoren, wie PPAR $\gamma$ , unabhängig von ERs vaskuläre Effekte zu vermitteln (9).

### **1.2.5.4 Ligandenunabhängige Aktivierung von Östrogenrezeptoren**

In dem ligandenunabhängigen Signalweg werden ERs östrogenunabhängig aktiviert. Als solche Aktivatoren werden Neurotransmitter, wie Dopamin, und Wachstumsfaktoren, wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der insulinähnliche Wachstumsfaktor-1 (IGF-1), beschrieben (9, 16, 23). Diese aktivieren unter anderem die SM PKC, PKA, MAPK und PI3K. Die Aktivierung der Liganden-unabhängigen Signalwege ist weitgehend mit der Phosphorylierung von zytosolischen oder direkt an EREs gebundenen ERs durch zelluläre Proteinkinasen mit darauffolgender Genregulation verbunden (9, 23). Beispielsweise kann EGF die Phosphorylierung von Ser118 in der AF-1-Domäne von ER  $\alpha$  auslösen und die Transkriptionsaktivität von ER  $\alpha$  aktivieren. Ebenso kann die Proteinkinase A die Phosphorylierung von Ser236 in der DNA-Bindungsdomäne von ER  $\alpha$  auslösen und die Dimerisierung des Rezeptors regulieren (9).



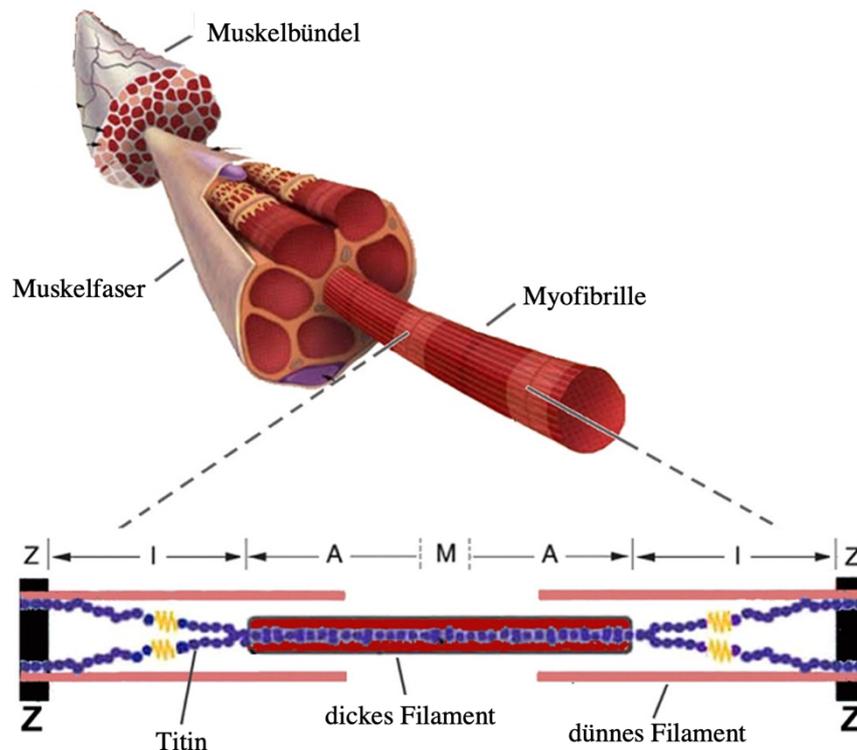
**Abbildung 3: Wirkmechanismus von Östrogen (E2) und Fulvestrant (Fulv) über Östrogenrezeptoren (ERs) in der Herzmuskelzelle.** Genomischer oder direkter Weg: E2 aktiviert die zytosolischen und an Hitzeschockprotein 90 (HSP90) gebundenen ER $\alpha$  und ER $\beta$ , was zur Dimerisierung der ERs und zur direkten DNA-Bindung an Estrogen-Response-Elemente (ERE) führt, bevor die Genregulation moduliert wird. Alternativ kann E2 direkt ERs binden, die bereits an DNA gebunden sind. Nicht-genomischer, indirekter oder schneller Weg: E2 aktiviert ERs (G-gekoppelte Östrogenrezeptoren (GPER30), ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) in der Membran, wodurch Proteinsignalkaskaden aktiviert werden, die über Koaktivatoren (CoA) und Transkriptionsfaktoren (TF) die nachgeschaltete Gentranskription beeinflussen. Liganden-unabhängiger Signalweg: In Abwesenheit von E2 führt die Wachstumsfaktor-Signalisierung zur ER-Aktivierung und Zielgen-Transkription durch Phosphorylierung des ERs oder seiner assoziierten Coregulatoren. Durch die hochaffine Bindung von Fulv an ERs (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) wird die Dimerisierung gehemmt, was zum ER-Abbau und zur Inaktivierung von Östrogen-vermittelnden Genen führt. AC, Adenylatzyklase; AKT, Proteinkinase B; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; Coa, Coregulator; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; e, 17 $\beta$ -Östradiol; MAPK, mitogenaktivierte Kinasen; PI3K, Phosphoinositol 3 - Kinase; STAT, Signaltransducer und Aktivatoren der Transkription; TF, Transkriptionsfaktor.

### 1.3 Titin

Die Wissenschaftler Jean Hanson und Hugh Huxley wiesen im Jahr 1953 die filamentöse Struktur der kleinsten kontraktile Einheit des Muskels, die Sarkomere, mikroskopisch nach (24). Die quergestreifte Muskulatur ist durch die abwechselnd geordneten Anordnungen von dicken (Myosin) und dünnen (Aktin) Filamenten charakterisiert (25). Das dritte elastische Filament wurde erst 1976 durch Koscak Maruyama und seine Mitarbeiter aus Muskelfasern isoliert und erhielt den Namen „Connectin“. Drei Jahre später wurde das Protein durch Kuang Wang und seine Mitarbeiter mittels Gelelektrophorese nachgewiesen und wurde auf Grund seines hohen Molekulargewichts von fast 4 MDa umbenannt (24, 26). Das bis zum jetzigen Zeitpunkt größte bekannte menschliche Protein des Körpers trägt seit seinem Nachweis den Namen „Titin“ (24, 27).

Das Riesenprotein Titin erstreckt sich über ein Halbsarkomer. Es reicht von der Z-Scheibe bis zur M-Bande und bestimmt vor allem über die sarkomerische Viskoelastizität die passive Kraftentwicklung in quergestreifter Skelett- und Herzmuskulatur. Veränderungen der Titin-Elastizität wirken sich stark auf die Dehnbarkeit und die diastolische passive Steifheit des Myokards aus. Die Titin-Elastizität kann im sich entwickelnden und im erwachsenen gesunden Herzen sehr variabel und bei Herzerkrankungen pathologisch verändert sein. Darüber hinaus werden Titin weitere Funktionen zugeschrieben. Titin hält die dicken Filamente im Sarkomer zentriert und ermöglicht so eine optimale aktive Kraftentwicklung. Zudem nimmt es an dem Aufbau der Sarkomere teil. Über

einige seiner Bindungspartner ist das Riesenprotein an mechano-chemischen Signalereignissen beteiligt und kann für die längenabhängige Aktivierung des kontraktile Apparats, die dem Frank-Starling-Gesetz zugrunde liegt, entscheidend sein (28).



**Abbildung 4: Darstellung des Sarkomers im quergestreiften Muskel (modifiziert nach Ottenheim et al., 2011).** Die kleinste kontraktile Einheit des Muskels besteht aus 3 Hauptfilamenten: den dünnen (Aktin-) Filamenten, den dicken (Myosin-) Filamenten und dem größten Filamentprotein Titin. Die Aktinfilamente sind in der Z – Scheibe (Z) über Aktinin verankert. Die dicken Myosinfilamente sind zentral im Sarkomer lokalisiert. Myosin interagiert über seine Kopfdomäne und Querbrücken mit Aktin. Das Titinfilament überspannt ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe (Z) bis zur M-Bande (M). (I), Isotropes (I) – Band; A, anisotropes (A) – Band (29).

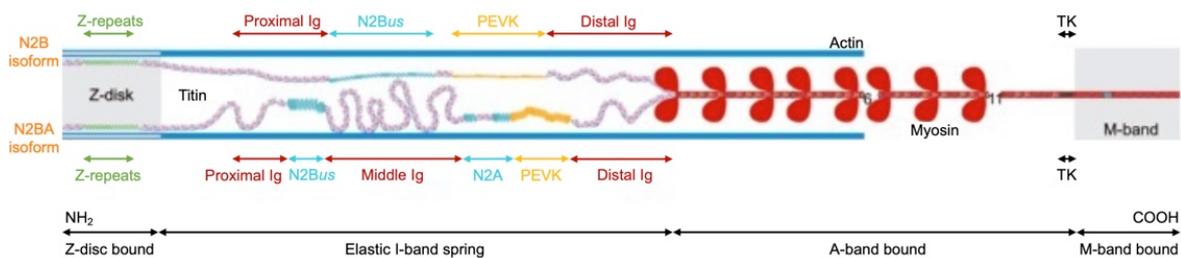
### 1.3.1 Aufbau und Struktur

Titin wird von einem einzigen Gen (TTN) auf Chromosom 2 codiert. Das TTN-Gen beinhaltet eine Sequenz von 294 kB und umfasst 363 Exons (30, 31). Alternative Spleißvorgänge des Gens führen zu drei muskel- und speziesspezifischen Hauptisoformvarianten. In der Skelettmuskulatur wird ausschließlich die N2A-Isoform (3,3-3,7 MDa) exprimiert. Kardiales Gewebe exprimiert zwei Titinisoformen. Die N2BA- (3,2-3,8 MDa) und N2B-Isoform (3 MDa) (31-33). Die N2B-Isoform (191 Exons) ist kürzer und steifer als die N2BA-Isoform (bis zu 313 Exons). Folglich wird mehr Kraft benötigt, um die steifere und kürzere N2B-Variante zu dehnen. Die N2BA-Isoform ist länger und elastischer (30, 34).

Das Titin-Molekül ist in vier Segmente, die entsprechend der Sarkomerstruktur organisiert sind, unterteilt. Im sogenannten Z-Scheiben-gebundenen Element befindet sich das N-Terminale Ende von Titin. Das I-Band Segment ist mit den elastischen Eigenschaften Titins assoziiert. Das A-Band gebundene Element ist für die Myosinstabilität von großer Bedeutung. Das C-Terminale Ende von

Titin ist im M-Band-gebundenen Element verankert und enthält eine Serin / Threonin Kinase-Domäne. Wie in der Z-Scheibe, wo Titin-Filamente aus gegenüberliegenden Sarkomeren überlappen, überlappen Titin-Filamente aus gegenüberliegenden Halbsarkomeren innerhalb der M-Bande und bilden ein zusammenhängendes Netzwerk entlang der Myofibrille (30, 35, 36).

Innerhalb des dehnbaren I-Band Segments finden die meisten alternativen Spleißvorgänge statt, sodass sich die kardialen Isoformen N2BA und N2B besonders in dieser Region unterscheiden (37, 38). Die längere N2BA-Isoform enthält neben den konstitutiv exprimierten proximalen und distalen Ig-Domänen zusätzlich die mittleren Ig-Domänen. Zudem wird in der längeren Isoform die N2A-Variante, die auch in der Skelettmuskulatur vorkommt, exprimiert (30). In beiden kardialen Isoformen werden sowohl das herzspezifische N2B-Element mit der N2B *unique sequence* (N2Bus), als auch die PEVK-Region, die reich an Prolin- (P), Glutamat- (E), Valin- (V) und Lysin- (K) Resten ist, exprimiert. (37, 38). Die PEVK-Region unterliegt im Gegensatz zu der N2Bus alternativen Spleißvorgängen, sodass es zu unterschiedlichen Längen der Region in den kardialen Isoformen N2BA und N2B kommt. In der N2B-Isoform ist die PEVK-Region kürzer verglichen mit der N2BA-Isoform. Aufgrund der zusätzlichen Ig-Domänen und der längeren PEVK Region weist die N2BA-Isoform eine deutlich größere Länge als die N2B-Isoform auf (30, 39).

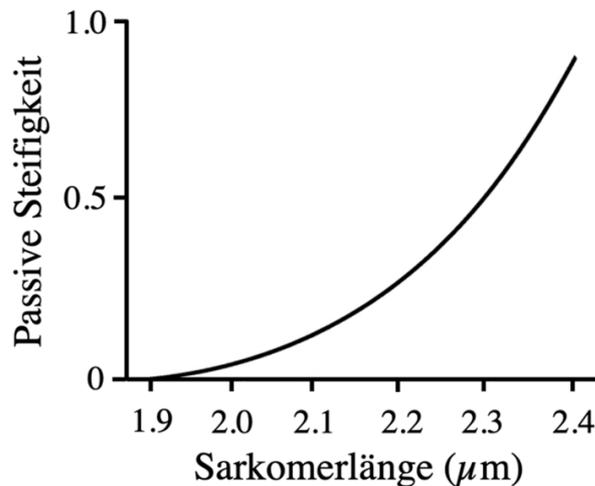


**Abbildung 5: Darstellung der Titinstruktur in einem kardialen Halbsarkomer (modifiziert nach Koser et al., 2019).** Koexprimierte kardiale Titinisoformen N2BA und N2B sind im Halbsarkomer eingezeichnet. Molekulare Federerlemente innerhalb des elastischen I-Bands sind farblich hervorgehoben. TK, Titin-Kinase-Domäne (30).

### 1.3.2 Titin-abhängige passive Steifigkeit der Muskeln

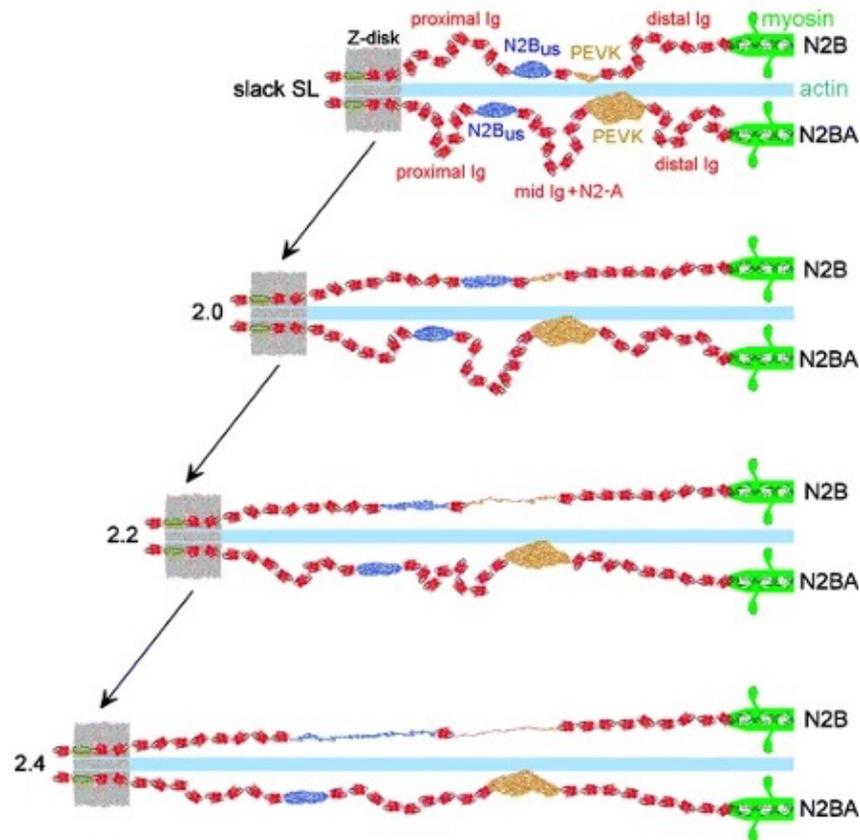
Die dehnbare I-Band Region von Titin fungiert als „molekulare Feder“ und ist für die Generierung einer passiven Kraft bei Dehnung der Sarkomere verantwortlich (40). Die passive Kraft entsteht bei Dehnung eines Muskels über seine Ruhesarkomerlänge hinaus. Die Kraft, die der Dehnung des Muskels entgegengerichtet ist, wird passive Kraft genannt. Dargestellt wird die Steifigkeitseigenschaft des Muskels mit Hilfe der Ruhedehnungskurve. Je größer die Dehnung und somit die Spannung des Muskels ist, desto größer ist die dadurch entwickelte passive Kraft. Mit zunehmender Streckung steigt die Ruhedehnungskurve des Muskels exponentiell an (41). Die passive Spannung ist für die diastolische Funktion des Herzens essentiell, da dadurch die diastolische Füllungsphase, somit die Vorlast und das Herzschlagvolumen des nächsten Kontraktionszyklus des

Herzens bestimmt werden (31). Zudem leistet Titin über seine passive Kraftentwicklung einen signifikanten Anteil an der totalen myokardialen Wandspannung (30).



**Abbildung 6: Ruhedehnungskurve einer Herzmuskelzelle (modifiziert nach Koser et al., 2019).** Exponentieller Anstieg der Titin basierten myokardialen Spannung bei Dehnung eines Kardiomyozyten über seine Ruhesarkomerlänge ( $1,9 \mu\text{m}$ ) hinaus (30).

Die elastischen Segmente im I-Band sind für die elastischen und steifen Eigenschaften von Titin von großer Bedeutung. Das Verhältnis zwischen Kraft und sequentieller Dehnung der Titinmoleküle beschreibt das sogenannte *wormlike chain model* der entropischen Elastizität. Die I-Band-Federelemente verhalten sich wie seriell verknüpfte Biopolymere. Diese erzeugen bei der Dehnung eine entropische Kraft, um der Dehnung entgegenzuwirken. Bei kürzeren Sarkomerlängen und geringen Dehnungskräften (bis zu  $\sim 1 \text{ pN/Titinmolekül}$ ) wird Titin durch die Begradigung der kurzen Linker zwischen den Tandem-Ig-Domänen zuerst gedehnt. Neue Studien berichten ferner von reversiblen proximalen und distalen Ig-Domänen-Entfaltungen, die bei niedrigen, physiologischen Kräften unter  $\sim 10 \text{ pN/Titin}$  stattfinden. Die früheren Überlegungen eines Sicherheitsmechanismus durch die Ig-Domänen-Entfaltungen, die hohe Kräfte im Sarkomer begrenzen, aber bei physiologischen Sarkomerlängen und Dehnungskräften nicht stattfinden, werden kritisch hinterfragt. Durch die Entfaltung der Ig-Domänen bei niedrigen Dehnungskräften wird elastische Energie gespeichert. Diese wird durch die Rückfaltung freigesetzt und unterstützt möglicherweise die aktive Muskelkontraktion. Intermittierende bis hohe Dehnungskräfte (bis zu  $\sim 10 \text{ pN/Titin}$ ) verlängern zunächst das PEVK-Segment, und schließlich auch das N2Bus-Element (30).



**Abbildung 7: Titin als entropische Feder im Halbsarkomer (Linke und Grützner, 2008).** Sequentielle Entfaltung der I-Band Titinsegmente der N2B und N2BA-Isoformen bei Dehnung des Sarkomers von der Ruhesarkomerlänge (SL) bis 2,4  $\mu\text{m}$ . Zunächst beginnt die Begradigung der Ig-Domänen. Daran schließt sich bei weiterer Dehnung die PEVK-Entfaltung, gefolgt von der N2Bus- Ausdehnung an (30, 42).

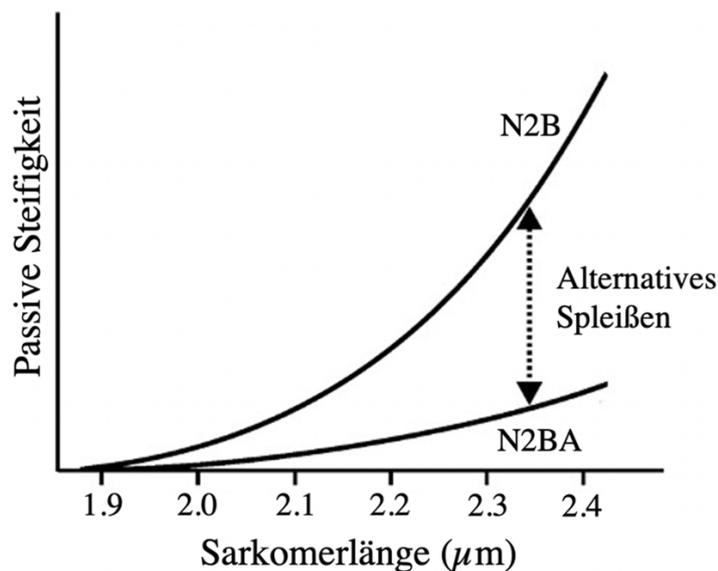
### 1.3.3 Modulation der passiven Steifigkeit

Die elastischen Federeigenschaften von Titin sind nicht konstant. Vielmehr können diese in einem dynamischen Prozess moduliert werden. Die Titin-abhängige passive Steifigkeit der myokardialen Zellen passt sich an physiologische und pathologische Prozesse an. Dies geschieht über Langzeit- und Kurzzeitprozesse. Ein wichtiger Langzeitprozess ist der sogenannte Titin-Isoformen-Switch, bei dem die Modulation der Titinsteifigkeit durch das Umstellen der Isoformen erreicht wird (30). Dieser Prozess kann mehrere Wochen oder Monate benötigen (43). Schnelle Steifigkeitsveränderungen finden über posttranslationale Modifikationen des elastischen Titin I-Band Segments statt (30).

#### 1.3.3.1 Veränderungen der Isoformenverhältnisse

Die Anzahl der Titinmoleküle pro Myosinfilament scheint konstant zu sein (6 pro halbes dickes Filament). Das Expressionsverhältnis von N2BA zu N2B-Titin ist allerdings variabel (44). Durch das alternative Spleißen der Exons im elastischen I-Band Segment entstehen mehrere Titin-Isoformen mit unterschiedlichen Steifigkeitsgraden. Das kardiale Isoformenverhältnis von N2BA zu N2B-Titin bestimmt die Titin-abhängige passive Steifigkeit der Kardiomyozyten und folglich der gesamten myokardialen Wandspannung. Das Verhältnis der beiden kardialen Isoformen ist nicht

statisch, sondern verändert sich während der perinatalen Entwicklung. Fetales kardiales Titin weist eine sehr große N2BA Isoform auf, die prä- oder perinatal schon durch kleinere N2BA-Titine und die N2B-Isoform ersetzt wird. Das hohe N2BA zu N2B Verhältnis in Jungtieren wird in ausgewachsenen Tieren durch Expression der prädominanten kürzeren und steiferen N2B-Isoform weiter verändert (30). Der große Unterschied des Isoformenverhältnisses im fetalen verglichen zu dem des adulten Herzens ist Ausdruck eines pränatalen Adaptationsprozesses auf einen verminderten ventrikulären Fülldruck. Zusätzlich soll die höhere Elastizität der fetalen Kardiomyozyten den Zusammenbau der Sarkomere in der pränatalen Entwicklung erleichtern (45). Auch zwischen verschiedenen Spezies wird ein unterschiedliches Isoformenverhältnis exprimiert, das für die variable passive myokardiale Steifigkeit verantwortlich ist. In kleineren Lebewesen wird auf Grund des erhöhten Bedarfs an passiven Rückstellkräften des Herzens bei schneller Herzfrequenz ein niedriges N2BA zu N2B Verhältnis gefunden (N2BA : N2B Verhältnis 10 : 90 bei adulten Rattenherzen). In größeren adulten Lebewesen mit langsameren Herzfrequenzen ist das N2BA zu N2B Verhältnis höher (N2BA : N2B Verhältnis 40 : 60 bei adulten menschlichen Herzen) (30, 31, 43). Das Herz, das in das linke und rechte Herz unterteilt wird, weist ebenfalls ein unterschiedliches Isoformenverhältnis auf. Die rechte Kammer (Ventrikel), die das Blut in das Niederdrucksystem der Lungenstrombahn befördert, exprimiert ein höheres N2BA zu N2B Verhältnis als der linke Ventrikel, der über den Körperkreislauf mit dem Hochdrucksystem verbunden. Auch der rechte Vorhof (Atrium) exprimiert einen niedrigeren Anteil der steiferen N2B-Isoform als das linke Atrium (46).

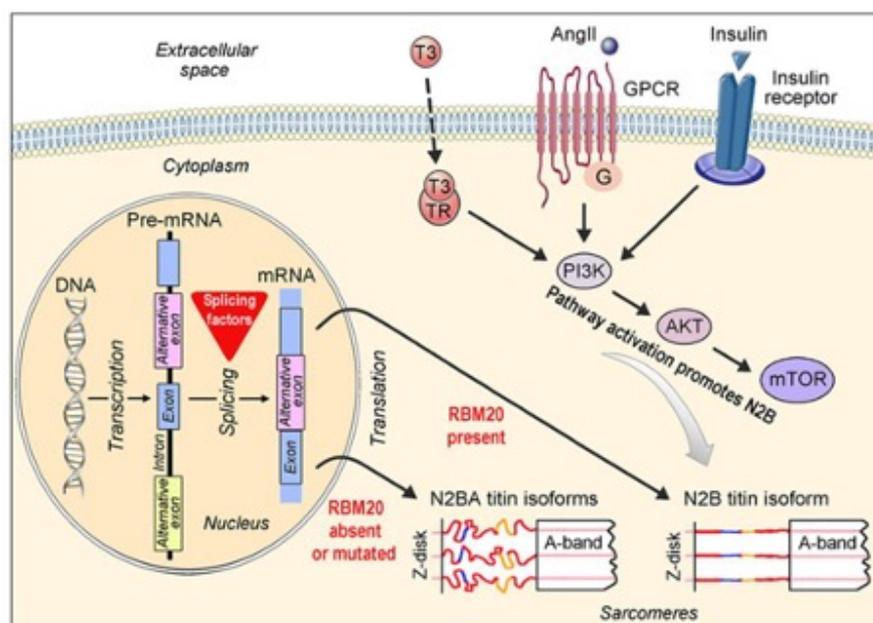


**Abbildung 8: Veränderung der passiven Kraftentwicklung in Kardiomyozyten aufgrund des Isoformenswitches (modifiziert nach Fukada et al., 2010).** Alternatives Spleißen führt zu unterschiedlichen kardialen Titin-Isoformen. Kardiomyozyten mit einem hohen N2B – Anteil entwickeln eine höhere passive Kraft als stark N2BA exprimierende Myozyten (47).

Der Titin-Isoformen-Switch findet auch bei Patienten mit Herzerkrankungen statt. Untersuchungen von Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit (KHK) zeigten erhöhte N2BA-Titinspiegel. Auf myofibrillärer Ebene wurde eine verringerte Titin-abhängige myokardiale Steifigkeit nachgewiesen

(48). Ähnliche Veränderungen zu einem pathologisch erhöhtem N2BA zu N2B Verhältnis wurden bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) gefunden (49, 50). Gleiche Veränderungen wurden ebenfalls bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurfleistung (engl. *heart failure with preserved ejection fraction*; HFpEF) nachgewiesen. Diese Patientengruppe macht etwa die Hälfte aller Herzinsuffizienz-Fälle aus und ist durch eine erhöhte diastolische Steifigkeit gekennzeichnet (51, 52). Die erhöhte Expression der elastischeren N2BA-Isoform stellt einen Adaptationsvorgang des Herzens auf die pathologische myokardiale Wandsteifigkeitszunahme - bedingt durch vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix - dar und soll der gesteigerten Steifigkeit entgegenwirken (43, 49).

Veränderungen in der Expression der Titin-Isoformenzusammensetzung unterliegen der Kontrolle des kardialen Spleißfaktors RNA-bindendes Protein 20 (RBM20). Niedrige RBM20-Spiegel führen zur Expression großer, elastischer Titin-Isoformen (44). Die Spleißrepressoraktivität wird über verschiedene Mechanismen reguliert. RBM20 wird durch das Polypyrimidin-Trakt-Bindungsprotein 4 gehemmt. Insulin und das Schilddrüsenhormon T3 beeinflussen über den Phosphoinositid 3 Kinase/Proteinkinase B (PI3K-AKT-mTOR) Kinaseweg die Aktivität des RBM20, wodurch es zur gesteigerten Expression der N2B-Isoform kommt (30).



**Abbildung 9: Regulationsmechanismen der kardialen Titin – Isoformen Expression (modifiziert nach Linke und Hamdani, 2014).** Darstellung der bekannten Mechanismen, die das Expressionsmuster der kardialen Titin-Isoformen beeinflussen. AKT- Proteinkinase B, Ang II – Angiotensin II, G – G-Protein, GPCR – G-Protein gekoppelter Rezeptor, mTOR – Mammalian Target of Rapamycin, PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase, RBM20 – RNA-binding motif protein-20, T3 – Schilddrüsenhormon, TR – Schilddrüsenhormonrezeptor (28).

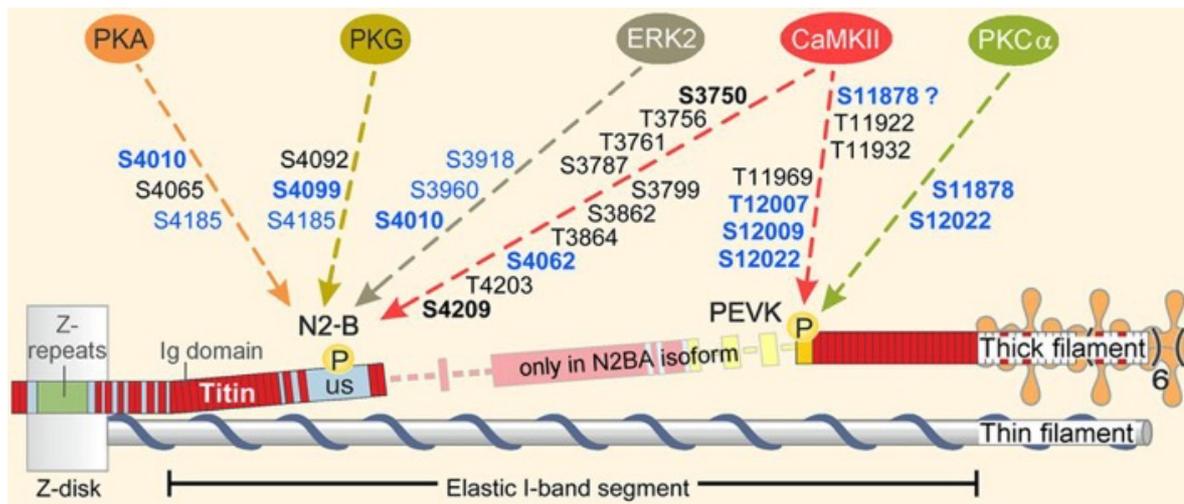
### 1.3.3.2 Posttranslationale Modifikation des elastischen I-Band Segments

Schnelle Veränderungen der kontraktilen Leistung des Herzens finden über die PTMs von Sarkomerproteinen statt. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung stellen eine der häufigsten Mechanismen posttranslationaler Modifikationen zur Regulierung der Sarkomerfunktion dar. Veränderungen der Titin-abhängigen myokardialen Steifigkeit mit Auswirkungen auf die Sarkomerfunktion wird mittels PTMs des Sarkomerproteins Titin erreicht (30). Die Phosphorylierungen finden in der dehnbaren I-Band Region von Titin statt. Die dort lokalisierte PEVK-Region und N2Bus werden hauptsächlich posttranslational modifiziert (30, 44).

Untersuchungen ergaben fünf Hauptkinasen, die Titin in diesen beiden Regionen phosphorylieren. Die Proteinkinase A (PKA) und C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) – als wichtigste kardiale PKC Isoform, die zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) abhängige Proteinkinase G (PKG), die extrazellulär signalregulierte Kinase 1/2 (ERK 1/2) sowie die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II  $\delta$  (CaMKII  $\delta$ ) verändern die passive Myofilamentsteifigkeit. Die PEVK-Region wird von der PKC $\alpha$  und der CaMKII  $\delta$ , die N2Bus von der PKA, PKG, ERK 1/2 und der CaMKII  $\delta$  phosphoryliert (30). Einzelmolekül-Kraft-Dehnungs-Messungen haben gezeigt, dass Phosphorylierungen der N2Bus zu einer Verlängerung der Persistenzlänge ( $L_p$ ) (physikalischen Maß der Steifigkeit der Polymerkette) führen. Dies geht mit einer Reduktion der passiven Steifigkeit einher (30, 53-55). Umgekehrt verhält es sich mit der Phosphorylierung der PEVK-Region. Auf Grund der Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  nimmt die Persistenzlänge ab, wodurch die Titin-abhängige passive Steifigkeit erhöht wird (56). Als einzige der fünf Hauptkinasen kann die CaMKII $\delta$ , als prädominante Isoform der CaMKII im Herzen, beide Domänen im I-Band Titin phosphorylieren (30). Die Phosphorylierungen der CaMKII $\delta$  führen insgesamt zu einer Steifigkeitsabnahme des elastischen Federsegments. Der höhere Phosphorylierungsgrad der N2Bus im Vergleich zur PEVK-Region wird als möglicher Erklärungsansatz genutzt (57).

Die unterschiedlichen Effekte der phosphorylierten I-Band Regionen PEVK und N2Bus auf die passive Myokardsteifigkeit wirken zunächst widersprüchlich. Erklärt werden könnte dies allerdings mit der Aminosäuresequenzen der jeweiligen Titinsegmente. Die N2Bus enthält im Gegensatz zur PEVK-Domäne eine hohe Menge an sauren (negativ geladenen) Aminosäuren, was zu einem niedrigen isoelektrischen Punkt dieser Region führt. Der Einbau von negativ geladenen Phosphatresten könnte zur intramolekularen elektrostatischen Abstoßung führen. Durch die instabilisierende Wirkung der Phosphate auf die N2Bus könnte die Persistenzlänge erhöht und folglich die Steifigkeit von Titin gesenkt werden. Im Gegensatz dazu führt der Einbau der Phosphate in die aus vielen basischen (positiv geladenen) Aminosäuren bestehende PEVK-Region zu einer stabilisierenden Wirkung. Eine elektrostatische Abstoßung würde verhindert und möglicherweise zusätzliche intramolekulare ionische Wechselwirkungen erzeugt werden. Die Folge wären eine verminderte Persistenzlänge mit konsekutiv erhöhter Steifigkeit (58). Die verschiedenen





**Abbildung 11: Proteinkinasen und ihre Phosphorylierungsstellen innerhalb der N2Bus und PEVK von kardialem Titin (modifiziert nach Linke und Hamdani, 2014).** Die bisher bekannten Phosphosites innerhalb der N2Bus- und der PEVK-Region sind entsprechend der humanen Titin-Sequenz nummeriert (UniProtKB identifier Q8WZ42-1) nummeriert. Evolutionär konservierte Phosphorylierungsstellen sind in Fettdruck, durch eine Stellen-spezifische Methode bestätigte Phosphorylierungsstellen sind in blau, alle anderen Stellen sind in normaler schwarzer Schrift dargestellt. CaMKII, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-II; ERK2, extracellular signal-regulated kinase-2; PEVK, Titinregion reich an Prolin, Glutamat, Valin und Lysin; PKA, Proteinkinase A; PKC $\alpha$ , Proteinkinase C $\alpha$ ; PKG, cGMP-abhängige Proteinkinase G; us, unique sequence (28).

Posttranslationale Modifikationen des I-Band Titins, als Modulatoren der passiven Steifigkeit, sind in der Pathophysiologie des Herzens relevant. Bei Herzerkrankungen sind viele Signalwege, die die Titinphosphorylierung beeinflussen, verändert. Pathologisch veränderte Titinphosphorylierungen wirken sich negativ auf die Herzfunktion aus. Eine zu hohe Titin-abhängige myokardiale Steifigkeit erschwert die Füllung des Herzens in der Diastole, während eine niedrigere unter der Norm liegende Steifigkeit die längenabhängige Aktivierung der Myozyten dämpft. Die über den Frank-Starling-Mechanismus regulierte systolische Pumpfunktion wird folglich beeinträchtigt (30). Herzgewebeanalysen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und hypertropher Kardiomyopathie (HCM) zeigten im Vergleich zu gesunden Spenderherzen verminderte Phosphorylierungen in den Phosphorylierungsstellen S4010, S4099 und S4185, die im N2B-Titin stärker zum Vorschein traten als in der N2BA-Isoform. Lediglich für die CaMKII $\delta$ -abhängige S4062 wurde eine vermehrte Phosphorylierung bei Transplantationspatienten mit einer Herzinsuffizienz mit reduzierter Auswurfleistung (engl. *heart failure with reduced ejection fraction*; HFrEF) im Endstadium nachgewiesen. Davon wurde allerdings nur in einer Studie berichtet. Eine reduzierte Phosphorylierung der N2Bus scheint bei herzinsuffizienten Patienten die Regel zu sein. Die daraus resultierende Steifigkeitszunahme wurde in der pathologisch veränderten PEVK-Region ebenfalls nachgewiesen. Die PKC $\alpha$ -abhängige S11878 wies bei unveränderter PKC $\alpha$ - und CaMKII $\delta$ -abhängiger S12022 signifikant vermehrte Phosphorylierungen auf. (30, 58). Insgesamt zeigten die Humanstudien zur Phosphorylierung von Titin bei Herzerkrankungen eine Abnahme der Gesamttitinphosphorylierung und der ortsspezifischen N2Bus-Phosphorylierung, während die Hyperphosphorylierung an der PEVK-Phosphorylierungsstelle S11878 auftrat. Ähnliche

Studienergebnisse wurden in Tiermodellen beschrieben und stimmten mit den Ergebnissen der Humanstudien überein (30).

## **1.4 Fragestellung**

Der protektive Effekt von Östrogen für das Herz-Kreislaufsystem und die Entwicklung von Herzinsuffizienzen wurde in klinischen und experimentellen Studien gezeigt. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Veränderungen der Titineigenschaften in geschlechtsspezifischer und östrogenabhängiger Weise auftreten. Hierzu wurden die Titinisoformen und -phosphorylierungen von linksventrikulärem Herzgewebe von männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten miteinander verglichen.

Ferner wurde analysiert, ob akute Veränderungen in den kardialen Titinphosphorylierungen auftreten. Kultivierte adulte männliche Rattenkardiomyozyten wurden für 30 oder 60 Minuten mit Östrogen (10nM oder 100 nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (10nM oder 100 nM) oder einer Kombination aus beiden behandelt und anschließend Titin und ausgewählte relevante Kinasen hinsichtlich ihres Phosphorylierungsstatus mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Zusätzlich wurden die Lokalisationen der an schnellen Signaltransduktionen beteiligten G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptoren in Kardiomyozyten analysiert.

## **1.5 Lizenzen für Abbildungen**

Für die Verwendung von nicht selbsterstellten Abbildungen wurde, sofern nicht ausdrücklich auf deren uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium unter ordnungsgemäßer Zitierung des Originalwerks hingewiesen wurde, vorab eine Lizenz beantragt und ordnungsgemäß eingeholt. Die Lizenznummern sind im Gliederungspunkt „Anhang“ gesondert gelistet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
199 Medium	MERCK
Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Blebbistatin	Sigma Aldrich
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon Scientific
Bradford	Thermo Fischer
Calciumchlorid	Sigma Aldrich
Carnitin	Sigma Aldrich
Collagenase Typ II	Sigma Aldrich
Collagenase Typ I	Biochrom
Creatine	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detection reagent)	7Bioscience
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Glucose	MERCK
Glycerol	Sigma Aldrich
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	AppliChem
Heparin	Calbiochem
<i>Heparin – Natrium – 25000 IE</i>	Ratiopharm
HEPES	Sigma Aldrich
Imperial protein stain	Thermo Scientific
Isofluran	Piramal Healthcare
Isopropanol	MERCK
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich

Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma Aldrich
Metformin	Sigma Aldrich
Methanol	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	MERCK
Natriumdihydrogenphosphat	MERCK
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Natriumhydrogencarbonat	MERCK
Natriumhydroxid	ROTH
Nonidet P40	Sigma Aldrich
Penicillin / Streptomycin	MERCK
Phenolrot	Sigma Aldrich
Protease	Sigma Aldrich
Pyruvate	Sigma Aldrich
Salzsäure 32 %	VWR
Serva Blue	Serva Electrophoresis GmbH
Taurin	Sigma Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Triton X – 100	Appli Chem
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Sigma Aldrich
Urea	Sigma Aldrich

## 2.1.2 Laborgeräte

Zur Durchführung der Versuche wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Laborgeräte verwendet.

Tab. 2: Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Brutschrank	Thermo Scientific
ECL Imager Fusion FX7	Vilber
Eismaschine	Ziegra
Feinwaage	Mettler
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse Ti
Inverses Lichtmikroskop	Motic AE 2000
Kühlschrank +4°C	Liebherr
Kühlschrank - 20°C	Liebherr
Kühlschrank -80°C	Thermo Scientific
Magnetrührer	VWR

Mikrowelle	AEG
Molecular Imager Gel Doc XR System	Bio-Rad
pH Meter	Mettler
Power Pack	Biometra
Rollpumpe	Gilson
Reagenzienschüttler	VWR
Schlauchpumpe	Gilson
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific
SDS – Gelelektrophorese System	Biometra
SDS – Gelelektrophorese System	Biorad
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech
Taumel - Rollenmischer	CAT
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	VWR
Trans Blot Turbo System	Bio-Rad
Transiluminator	Kaiser
Vakuumpumpe	Welch
Waage	KERN
Wasserbad	Köttermann
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge <i>Biofuge 13</i>	Heraeus
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus
Zentrifuge <i>Rotofix 32</i>	Heraeus

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Tab. 3: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) pH-Wert > 8,3
10x TBST	0,2 M Tris 1,5 M NaCl 1% Tween – 20 pH 7,4
4x SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS) pH 6,8
4x SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS) pH 8,8
Anodenpuffer	300 mM Tris 100 mM Tricine pH 8,8
Blockierungslösung	2% BSA in 1x TBST

CUT (Schneidelösung)	DCP – Lösung 100 mM Calciumchlorid 1% BSA (Fraktion V)
DCP (Verdau-Collagenase-Protease-Lösung)	Perfusionspuffer 100 mM Calciumchlorid Protease 6 U/ml Collagenase Typ II 200 U/ml
Fixierlösung	7% Essigsäure 500 ml H <sub>2</sub> O
Heparin – Natrium Injektions-/Infusionslösung	5000 I.E./ml Heparin – Natrium 12,5mg/ml Benzylalkohol Im Text 1000U pro 300g KG (5000U≈200μl)
Heparinlösung	7,5 ml Perfusionspuffer 2mg Heparin
High-Calcium Lösung	Perfusionspuffer 400 μM Calciumchlorid 1% BSA (Fraktion V)
Kathodenpuffer	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris pH 8,7
Low-Calcium Lösung	Perfusionspuffer 200 μM Calciumchlorid 1 % BSA (Fraktion V)
PFA 4%	4g PFA 100ml PBS
Perfusionspuffer Adulte Rattenkardiomyozyten	130 mM Natriumchlorid 5,4 mM Kaliumchlorid 1,25 mM Magnesiumchlorid 0,33 mM Dinatriumhydrogenphosphat 25 mM Hepes 20 mM Glucose 3 mM Pyruvate 5 mM Creatine 2 mM Carnitine 5 mM Taurine
1x Phosphate buffered saline (PBS) Puffer	2,7 mM Kaliumchlorid 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat 140 mM Natriumchlorid 10 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,4
PVDF destain	10% Essigsäure 40% Ethanol
PVDF stain	0,075% Serva Blue Methanol
SDS-Probenpuffer	8M Urea 2M Thiourea 3% Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% Serva Blue 10% Glycerol 0,05 M Tris / HCl pH 6,8
Stripping Puffer	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2 % Nonident P40 0,1 M β-Mercaptoethanol frisch zugeben
Titinprobenpuffer	8 M Urea

2M Thiourea  
 3% SDS  
 0,035% Serva Blue  
 10% Glycerol  
 50mM Tris

## 2.1.4 Zellkulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten

Tab. 4: Zellkulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten

Medium	Zusammensetzung
<b>Resuspensionsmedium</b> <i>M199 Hank's cell culture medium</i>	10 % FBS superior 1 % Penicillin/Streptomycin 5 mM Creatin 2 mM Carnitin 5 mM Taurin 10 nM Hepes
<b>Kulturmedium</b> <i>M199 Hank's cell culture medium</i>	10 % FBS superior 1 % Penicillin/Streptomycin 5 mM Creatin 2 mM Carnitin 5 mM Taurin 10 nM Hepes 12,5 mM Blebbistatin

## 2.1.5 Antikörper

Die kommerziell verfügbaren Antikörper, die im Western Blot verwendet wurden, sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
$\alpha$ -pPKC $\alpha$ T497	1:5000	Kaninchen	Abcam, ab76016
$\alpha$ -PKC $\alpha$	1:10000	Kaninchen	Abcam, ab32376
$\alpha$ -pTroponin I S23/24	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4004
$\alpha$ -Troponin I	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #4002
$\alpha$ - Phospho p42/44 MAPK (ERK 1/2)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2056
$\alpha$ - p42/44 ERK 1/2	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #9102
GPR30	1:500	Kaninchen	Abcam, ab39742
anti $\alpha$ Actinin Antibody sarcomeric	1:10000	Maus	Sigma Aldrich, #A7811
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase-linked	1:10000	Ziege	Cell Signaling, #7074

Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment (Alexa Flour 488 Conjugate)	1:500	Ziege	Cell Signaling, #4412
Anti-mouse IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment (Alexa Flour 555 Conjugate)	1:500	Ziege	Cell Signaling, #4409

Die Firma Eurogentec produzierte die phospho-spezifischen Titinantikörper mittels Immunisierung von Kaninchen. Dabei stammten die zur Impfung der Kaninchen verwendeten Antigene aus bestimmten Aminosäuresequenzen des humanen, kardialen Titingens (UniProtKB: Q8WZ42) (siehe Tabelle 5).

Nach Herstellung der polyklonalen Antikörper wurden die für das Phospho-Peptid spezifischen Antikörper affinitätschromatographisch gereinigt.

Über ein ELISA Verfahren (Enzyme-linked immunosorbant Assay) und die SDS – Page wurden die Sensitivität und Spezifität der Antikörper gegenüber dem jeweiligen Peptidantigen getestet.

Die einzelnen Titinantikörper sowie die zur Immunisierung benötigten Antigene zeigt Tabelle 6.

Tab. 6: Titinantikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Antigen	Quelle	Hersteller
anti-pN2-Bus S4010	1:2000	pN2-Bus S4010 (VRIIEEGK <b>p</b> SLRFPC)	Kaninchen	Eurogentec
anti-pPEVK S11878	1:1000	pPEVK S11878 (CEVV <b>LKp</b> SVLRKR)	Kaninchen	Eurogentec
anti-pPEVK S12022	1:2000	pPEVK S12022 (LRPG <b>p</b> SGGEKPP)	Kaninchen	Eurogentec
anti-PEVK pan	1:10000	PEVK pan (CEVV <b>LK</b> SVLRKR)	Kaninchen	Eurogentec

## 2.1.6 Stimulanzen

Zur Durchführung der Stimulation von kultivierten männlichen Rattenkardiomyozyten (RCMs) wurden die in der Tabelle 7 aufgeführten Stimulanzen verwendet.

Tab. 7: Stimulanzen

Stimulans	Konzentration bei Stimulation	Hersteller, Bestellnummer
Fulvestrant	10 nM oder 100 nM	AbMole, #M1966
Metformin hydrochloride	10 mM	Sigma Aldrich PHR1084
β - Estradiol	10 nM oder 100 nM	Sigma – Aldrich, #E8875

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Tötung zur Organentnahme**

Die Tötung der Ratten zur Organentnahme wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzausschuss der zuständigen Landesbehörde (Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) durchgeführt. Die Tötung zur Organentnahme wurde ordnungsgemäß angezeigt (Anzeigenummer: O29/11).

### **2.2.2 Geschlechtsspezifische Gewebeaufarbeitung**

Adulte männliche und weibliche Wistar Ratten im Alter von 8 bis 12 Wochen wurden mittels 2% Isofluran anästhesiert und anschließend dekapitiert.

Zur Organentnahme bei trächtigen Wistar Ratten wurden diese am Gestationstag 18 durch i.p. Injektion von Ketamin/Xylazin (100mg/kg Ketamin; 10 mg/kg Xylazin) anästhesiert. Nach anschließender Entnahme der Embryonen durch Kaiserschnitt wurde das Muttertier dekapitiert.

Nach Öffnen des Thorax wurde vor Entnahme des Herzens über eine Herzpunktion Blut entnommen. Mittels Zentrifugation wurde das Serum von den Blutzellen separiert und für die Hormonkonzentrationsbestimmung der Steroide abgenommen. Bis zur Bestimmung der Sexualhormonkonzentrationen durch ein externes Labor wurde das Serum bei - 80 °C eingefroren. Es erfolgte die Entnahme des Herzens. Anschließend wurde der linke Ventrikel herauspräpariert und in flüssigem Stickstoff bei - 195 °C schockgefroren. Für die mehrmalige Verwendung wurde das Gewebe bei - 80 °C aufbewahrt.

### **2.2.3 Solubilisieren und Proteinkonzentrationsbestimmung**

#### **2.2.3.1 Solubilisieren**

Zur Analyse der Signalwege und deren Einfluss auf die Titinphosphorylierung sowie des Titin-Isoformenverhältnis wurden die Proteine aus dem linken Ventrikel der Rattenkardiomyozyten isoliert.

Ein kleines Stück Gewebe wurde aus dem gefrorenen linken Ventrikel herausgeschnitten und in 100  $\mu$ l Titinprobenpuffer gelöst. Mittels mechanischer Auftrennung des Gewebes wurden die einzelnen Zellen zerstört. Die in den Zellen enthaltenen Proteine wurden frei und über die Bestandteile des Titinprobenpuffers denaturiert, was die nachfolgende Analyse der Proteine über biochemische Verfahren erleichterte.

Die in dem Titinprobenpuffer gelösten Proteine wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min in einem Eisbad gekühlt.

### **2.3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford – Photometer**

Das abgekühlte Probenröhrchen wurde bei 96 °C für 3 min erhitzt und anschließend für weitere 3 min zentrifugiert. Durch das Überführen der gelösten Proteine in ein neues Probenröhrchen wurden die Zellreste von den Proteinen getrennt.

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurden 2  $\mu$ l aus dem Probengemisch entnommen und im Verhältnis 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Wiederum 2  $\mu$ l der Verdünnungsprobe wurden in einem neuen Probenröhrchen mit 800  $\mu$ l deionisiertem Wasser und 200  $\mu$ l des lichtempfindlichen Bradfordreagenz gelöst. Nach Durchmischen wurde das zu analysierende Gemisch in eine lichtdurchlässige Küvette überführt.

Nach der Eichung des Photometers mit einer leeren Referenzküvette wurde nach dem Lambert – Beer'schen Gesetz bei einer Wellenlänge von 595 nM die Proteinkonzentration in der Küvette gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung der Probe mit unbekannter Proteinmenge wurde vorab eine Eichgerade erstellt. Durch Einsetzen des jeweils berechneten Extinktionswertes der zu untersuchenden Probe in die Gleichung der Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration für 2 $\mu$ l Verdünnungsprobe rechnerisch ermittelt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsverhältnisses wurde die Proteinkonzentration für 1 $\mu$ l Probe bestimmt. Das Polyacrylamidgel wurde mit einer Proteinkonzentration von 30  $\mu$ g pro Tasche beladen. Die dafür geeignete Menge an Probe wurde über Dreisatz berechnet.

### **2.3.4 Präparation, Kultivierung, Stimulations- und Inhibitionstests adulter Rattenkardiomyozyten**

#### **2.3.4.1 Präparation**

Die Zellpräparation wurde an adulten männlichen Wistar – Ratten im Alter von 8 bis 12 Wochen durchgeführt. Die Tiere wurden mittels 2% Isofluran betäubt und anschließend dekapitiert.

Der Thorax wurde eröffnet und das Herz freipräpariert. Um die Koagulation im Herzen zu stoppen, wurden 100  $\mu$ l des Antikoagulanz Heparin in das Herz injiziert. Das Herz wurde am Aortenbogen abgenommen und in eine Petrischale, die mit Heparin befüllt war, überführt. Nach anschließendem Wiegen des Herzens wurde dieses über den Ausführungsgang der Aorta an der Langendorffanlage mittels Bindefaden und Halterungsklemme fixiert.

Verschiedene im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmte Lösungen durchliefen retrograd das Herz. Zunächst wurde das Herz der Perfusionspufferlösung, in die Heparin gemischt wurde, für 5 min gespült. Das restliche im Herz befindliche Blut wurde herausgewaschen. Der Verdau der Kardiomyozyten begann anschließend mit den in der DCP – Lösung enthaltenen Enzymen, Kollagenase und Protease. Die Lösung durchlief das Herz je nach Gewicht bis zu maximal 30 min. Das Herz wurde abgenommen, mittels 2 spitzen Pinzetten mechanisch zerkleinert und in das 50 ml Falcon mit der CUT – Lösung überführt. Das Falcon verblieb für weitere 15 min im Wasserbad.

Unterstützend auf den enzymatischen Verdau wirkte das Auf – und Abpipettieren der Lösung, das alle 5 min vorsichtig durchgeführt wurde, um den Scherstress auf die Zellen möglichst gering zu halten. Um die gelösten Zellen von überschüssigem Herzgewebe zu isolieren, wurde die CUT – Lösung durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 200  $\mu\text{m}$  steril filtriert und anschließend für 2 min bei 500 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und die gewonnenen Zellen in Low – Calcium Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 500 rpm für 1 min wurde das Pellet in einer High – Calcium Lösung gelöst. Der Vorgang aus Zentrifugation und Überstandabnahme wurde wiederholt. Das vorgewärmte Kulturmedium (Medium 199 + 10% FBS) wurde anschließend hinzugegeben. Während einer Ruhephase von 10 min setzten sich die lebenden Zellen am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Die an der Oberfläche schwimmenden toten Zellen wurden abpipettiert. Das 50 ml Reaktionsgefäß wurde mit dem Kulturmedium aufgefüllt. Um die Kontraktion der überlebenden Zellen zu vermeiden, wurde zusätzlich der Myosin-ATPase Inhibitor Blebbistatin (12,5 nM) in das Medium gegeben.

#### **2.3.4.2 Kultivierung**

Die isolierten Kardiomyozyten wurden für 24 h mit dem Kulturmedium (Medium 199 + 10% FBS) bei 37°C im Brutschrank (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Für die Untersuchung der östrogenabhängigen Signalwege und deren Auswirkung auf die Titinphosphorylierung wurden die Zellen dafür in Zellkulturflaschen kultiviert.

Für den visuellen Nachweis der Östrogenrezeptoren wurden die im Kulturmedium enthaltenen Zellen auf eine 6 - WELL Schale, die jeweils 4 mit Laminin beschichtete Deckgläschen enthielten, verteilt.

Am nächsten Tag erfolgte der Mediumwechsel. Nach Zentrifugation der Zellkulturflaschen bei 500 rpm für 1 min mit anschließender Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen anschließend in PBS resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes, wurde PBS durch das hormonreduzierte Hungermedium mit 1% FBS – Anteil ersetzt.

Das Kulturmedium in der 6 – WELL Schale wurde abgenommen und die Zellen 3x mit PBS ausgewaschen. Auf die auf den Deckgläschen anhaftenden Zellen wurde das Hungermedium gegeben.

Die Zellkulturflaschen und 6 – Well Platte wurden anschließend für weitere 5 h im Brutschrank gelagert.

#### **2.3.4.3 Stimulationstests**

Nach 5 h im Hungermedium wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche auf 5 verschiedene Probenröhrchen mit einem Volumen von jeweils 1 ml verteilt. Die Zellen in den Probenröhrchen und

6 – Well Schalen wurden mit verschiedenen Stimulanzen und deren Kombinationen für 30 min oder 1 h stimuliert. Es wurden 5 Versuchsansätze durchgeführt, mit denen die Auswirkungen auf die östrogenabhängigen Signalwege, auf die Titinphosphorylierung und die Östrogenrezeptorlokalisierung untersucht wurden.

Die im Hungermedium gelösten adulten Rattenkardiomyozyten wurden mit 10 oder 100 nM Östrogen sowohl mit als auch ohne Zugabe von 10 oder 100 nM Fulvestrant, einem Östrogen – Antagonisten, behandelt.

Daneben wurden Zellen mit Metformin in einer Konzentration von 10 mM stimuliert. Metformin fungierte als Positivkontrolle, um das Ansprechen der zu untersuchenden Signalwege zu bestätigen.

Als Referenzprobe dienten nicht stimulierte, unbehandelte Kontrollzellen.

Nach Stimulation wurden die in den Probenröhrchen gelösten Zellen für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100  $\mu$ l Titinprobenpuffer pro Probenröhrchen gelöst.

Die auf den Deckgläschen angehafteten Zellen wurden nach Stimulation mit 2 % PFA – Lösung für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Durch das anschließende 2x Waschen der Zellen mit PBS wurde die 2 % PFA – Lösung entfernt.

### **2.3.5 Nachweis östrogenabhängiger Signalwege, deren Einfluss auf die Titinphosphorylierung und das Titinisoformenverhältnis**

#### **2.3.5.1 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE)**

Die Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE) ist eine Variante der Polyacrylamid – Gelelektrophorese.

Bei dem biochemischen Verfahren werden die proteinhaltigen Proben über eine diskontinuierliche Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt.

Bei dieser Variante der Gelelektrophorese werden zwei Gelpuffer angesetzt, zuerst das Trenngel, dann das Sammelgel, die sich in den pH – Werten, den Ionenstärken und in den Porengrößen unterscheiden. Das Polyacrylamid – Gel wird in geeignete Elektrolyte des Laufpuffers eingelegt.

Die zu analysierenden Proteine stammten aus den solubiliserten Gewebeproben und kultivierten Rattenkardiomyozyten, die in dem Titinprobenpuffer, einem Denaturierungspuffer gelöst wurden. Das Proteingemisch wurde 3 min lang bei 95° C erhitzt, um die Proteine von der Quartärstruktur in ihre Primärstruktur zu überführen. Dies wurde zudem über die drei Hauptkomponenten SDS, beta-Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DTT), die im Denaturierungspuffer enthalten sind, erreicht.

SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Aminosäureseitenketten des Proteins bindet und ihm somit eine negative Ladung – unabhängig von seiner Ausgangsladung – verleiht. Zusätzlich bricht es nicht kovalente Bindungen, was den Übergang in die Primärstruktur erleichtert.

Beta-Mercaptoethanol reduziert die in Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken zu freien Thiolen. Um die Oxidation der Sulfhydrylgruppen wieder zu Disulfidbrücken zu verhindern, wird der Probenpuffer mit dem reduzierenden Reagenz DTT versetzt. Dies dient der Konservierung der Proteine in einer denaturierten und reduzierten Form.

Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde das Proteingemisch in die jeweiligen Taschen des Sammelgels pipettiert. Mittels elektrischer Spannung von zunächst 15 mA pro Gelelektrophoresekammer wurden die negativ geladen Proteine im Sammelgel zur Anode gezogen.

Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngel (pH – Wert: 6,8 bzw. pH – Wert: 8,8) führt zum sogenannten Stapelungseffekt der Proteine zwischen den führenden Ionen (Chlorid) und den folgenden Ionen (Glycin), die dem Laufpuffer entstammen. Aufgrund der geringen Menge an Polyacrylamid ist die Porengröße des Sammelgels im Vergleich zum Trenngel sehr weit, weshalb die Proteine nicht aufgetrennt werden. Die Proteine bewegen sich unabhängig von ihrer Größe mit gleicher Geschwindigkeit. Beim Übergang in das basische Trenngel werden die Proteine von den Folgeionen überholt. Die Glycinationen liegen als Zwitterionen vor, die durch den basischen pH – Wert des Trenngels ihre teilweise bremsende positive Ladung verlieren.

Führende, folgende Ionen und Proteine trennten sich nun auf.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Trenngel hängt im konstanten elektrischen Feld von ihrer jeweiligen Größe ab. Durch den relativ großen Anteil an Polyacrylamid verringert sich die Porengröße im Trenngel, sodass große Proteine eine kürzere Laufstrecke besitzen als kleinere Proteine.

Im Trenngelbereich wurde das elektrische Feld auf 30 mA erhöht. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden nach Beendigung des Versuchs mit Hilfe eines mitgelaufenen Markerproteingemischs ausgewertet.

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel mit einem Polyacrylamidanteil von 10% blasenfrei zwischen die zwei Glasplatten der Firma BIORAD oder BIOMETRA gegossen. Um das Trenngel vor Austrocknung während des Auspolymerisierens zu schützen, wurde Isopropanol auf das Trenngel hinzugegeben. Das Auspolymerisieren war nach 30 min bei Raumtemperatur vollendet.

Isopropanol wurde abgeschüttet.

Auf das Trenngel wurde im nächsten Schritt das Sammelgel gegossen, das mit einem 10-er Probenkamm versehen wurde. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde der Kamm entfernt. Das Gel wurde in das Gelelektrophoresesystem der Firma BIOMETRA oder in das der Firma BIORAD, die mit Laufpuffer befüllt waren, gestellt. Die Taschen wurden anschließend mit den zu analysierenden Proben befüllt. Der Vorgang der SDS-Page dauerte 1,5 h.

Tab. 8: Komponenten des Standard SDS – Gels: Angaben für 4 Minigele

Lösung	Trenngel 10%	Sammelgel
30% Acrylamidlösung	5 ml	0,667 ml
H2O deionisiert	6,25 ml	3,65 ml
4x SDS - Trenngelpuffer	3,75 ml	-
4x SDS - Sammelgelpuffer	-	0,625 ml
TEMED	7,5 ml	15 $\mu$ l
APS	75 ml	50 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 ml</b>	<b>5 ml</b>

### 2.3.5.2 Agarose-stabilisierte SDS – PAGE

Um Titin von einem Proteingemisch zu separieren, wurde eine Sonderform der SDS – PAGE verwendet. Die Komponenten des Titingels mit einem Polyacrylamidanteil von 2,1 % wurden, wie in Tabelle 9 gezeigt, in folgender Reihenfolge gemischt, und anschließend zwischen die zwei Glasplatten der Firma BIORAD oder BIOMETRA blasenfrei gegossen. Zur Stabilisierung des 2,1%igen Polyacrylamidgels wurde Agarose zugegeben.

Tab. 9: Komponenten des Titingels: Angabe für 2 Minigele

Lösung	Titingel 2,1%
30 % Acrylamidlösung	1,4 ml
H2O deionisiert	6,67 ml
4x SDS Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20%	100 $\mu$ l
TEMED	11,5 $\mu$ l
<b>Auf 48°C erwärmen</b>	
APS	150 $\mu$ l
Agarose 1,5% (erhitzt)	6,67 ml
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 ml</b>

Das Gel wurde mit einem 10-er Probenkamm versehen und polymerisiert für mindestens 2 h bei Raumtemperatur aus. Anschließend wurde das Titingel in die Gelelektrophoresekammer der Firma BIORAD oder BIOMETRA gesetzt. Nach Befüllen der Taschen mit den Proben lief das Gel über Nacht bei 4 mA pro Kammer.

Diese Sonderform der SDS – PAGE beruht auf einer kontinuierlichen Gelelektrophorese. Im Gegensatz zur standardisierten SDS – PAGE wird bei dem Titingel ein Gelpuffer mit konstanten pH – Wert und Porengröße verwendet. Die Funktionsweise der Sonderform entspricht der standardisierten SDS – PAGE. Aufgrund des relativ geringen Anteils an Polyacrylamid werden

kleine und mittelgroße Proteine nicht im Gel gehalten und von der Anode ungehindert aus dem Gel gezogen. Nur die sehr großen Proteine wie Titin werden im Gel gehalten.

### **2.3.5.3 Western Blot**

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mithilfe eines Trans – Blot Turbo Transfer Systems (Bio Rad) durch ein gerichtetes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF-) Membran übertragen.

Die Vorgehensweise erfolgte nach dem Semi-Dry-Blotting-Protokoll. Auf die Anodenplatte wurden für die Proteinübertragung in Anodenpuffer getränkte 3 MM- Whatman-Papiere gelegt. Eine zuvor in Ethanol aktivierte PVDF – Membran wurde darübergelegt, auf die im Anschluss das jeweilige Gel platziert wurde. In Kathodenpuffer getränkte 3 MM – Whatman – Papiere deckten das Gel ab. Die Kathodenplatte wurde zum Schluss aufgelegt. Mit Beginn der Anlage des elektrischen Feldes startete der Transfer.

Bei Standardgelen wurde bei der Trans Turbo Blot Maschine eine Stromstärke von 1.5 A, eine Spannung von 12 V und eine Dauer von 12 min gewählt.

Bei Titingelen wurde bei der Trans Turbo Blot Maschine eine Stromstärke von 6 A, eine Spannung von 20 V und eine Dauer von 20 min gewählt.

Über das elektrische Feld werden die über SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode bewegt. Sobald die Trägermembran erreicht wird, bleiben die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an deren Oberfläche haften. Dies wird zusätzlich über das Ablösen des SDS von den Proteinen durch das Ethanol, in das die PVDF – Membran getränkt wurde, erleichtert.

Um den Transfererfolg zu überprüfen, wurde die Membran mit der PVDF – Färbelösung (PVDF – Stain) für 15 s angefärbt und anschließend mit PVDF – Entfärbelösung (PVDF – Destain) unter ständigem Schwenken so lange entfärbt, bis nur noch gut angefärbte Proteinbanden erkennbar waren.

Das anschließende 3x Waschen der Membran mit 1x TBST entfernte die Essigsäure der PVDF – Destain – Lösung von der Membran. Bevor nun die Epitope der Proteine über das ELISA – Verfahren nachgewiesen wurden, wurden die unspezifischen freien Bindungsstellen mit 2% Bovinem Serumalbumin (BSA), das in 1x TBST gelöst wurde, für 1 h blockiert.

Nach 3x Waschen der Membran mit 1x TBST für jeweils 5 min, wurde der Western – Blot über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde in seinem spezifischen Konzentrationsverhältnis in 0,5% BSA, das in 1x TBST gelöst wurde, gemischt. Der Primärantikörper detektierte über seinen Fab-Teil das Epitop des zu erkennenden Proteins.

Am nächsten Tag wurde nach Abgießen des primären Antikörpers die Membran mit 1x TBST 3x für jeweils 5 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 in 0,5% BSA, was in 1x TBST gelöst wurde, gemischt und die Membran für weitere 2 h damit inkubiert. Der sekundäre Antikörper erkennt speziesspezifisch den jeweiligen primären Antikörper. Er ist mit

Merrettichperoxidase gekoppelt (horseradish peroxidase, HRP), was eine Visualisierung der gebundenen Antikörper mittels Chemilumineszenz ermöglichte.

Hierzu wurde die Membran nach 3x Waschen mit 1x TBST mit den zuvor im Verhältnis 1:1 gemischten ECL – Detektionsreagenzien beschichtet. Das ECL-Substrat erkennt pg-Mengen des Antigens und macht das Vorhandensein von HRP mittels fotografischer Verfahren sichtbar. Die emittierten Signale wurden über den Fusion FX7 Chemilumineszenz – Imager detektiert.

Phosphorylierungsanalysen wurden auf demselben Western – Blot durchgeführt. Hierzu wurden phospho – spezifische Primär-Antikörper verwendet, deren Reaktionssignale ins Verhältnis zum Reaktionssignal des proteinspezifischen Antikörpers gesetzt wurden.

Nach Untersuchung der Phosphorylierungsstellen mittels phospho – spezifischer Primärantikörper, wurden diese im nächsten Schritt von der Membran gelöst. Dazu wurde die Membran für 40 min mit dem Stripping – Puffer inkubiert.

Nach 3 Waschschritten mit 1x TBST wurde die Membran erneut mit 2% BSA in 1x TBST für mindestens 1 h blockiert. Daraufhin wurde der primäre Gesamt – Antikörper eingesetzt und entsprechend analysiert.

Die densitometrische Auswertung der Signale erfolgte über das Programm Image J. Hier wurden die Signale der phospho – spezifischen Primärantikörper mit denen der primären Gesamtantikörper ins Verhältnis gesetzt und berechnet.

Die ausgewerteten Signale wurden auf die auf dem Blot befindlichen Kontrollen normiert und als relative Werte angegeben.

Dabei erfolgte die Normierung mittels Division der Mittelwerte der Kontrollen durch die detektierten Signale.

Jede Probe wurde auf mindestens 3 verschiedenen Blots analysiert und deren Ergebnisse gemittelt.

#### **2.3.5.4 Visualisierung von Titin**

##### **2.3.5.4.1 Visualisierung von Titin mittels Imperial Protein Stain**

Zur Visualisierung der Titinisoformen wurde nach der Gelelektrophorese das Gel in eine mit deionisiertem Wasser gefüllte Schale gelegt. Mit Hilfe des Orbitalschüttlers wurde das Gel 3x für jeweils 5 min mit deionisiertem Wasser gewaschen. Hierdurch wurde das aus dem Laufpuffer stammende SDS von dem Gel entfernt, sodass der Hintergrund auf dem Gel minimiert wurde. Das Wasser wurde durch das Coomassie Farbstoffreagenz Imperial Protein Stain ersetzt. Unter ständigem Schwenken auf dem Orbitalschüttler wurden spezifisch die Proteinbanden für mindestens eine Stunde angefärbt.

Als Entfärbemittel wurde deionisiertes Wasser über Nacht auf das Gel gegeben. Mehrere Wasserwechsel erhöhten dabei den Kontrast der gefärbten Proteinbanden zum entfärbten

Hintergrund. Die auf dem Gel enthaltenen Isoformen wurden anschließend über den Molecular Imager Gel Doc XR System visualisiert.

Über das Programm Image J wurde die Pixeldichte der einzelnen Isoformen quantifiziert. Die berechneten Signale der jeweiligen Isoform einer Probe wurden mit dem Gesamtsignal der Probe ins Verhältnis gesetzt, um den prozentualen Anteil der Isoform zu ermitteln.

#### **2.3.5.4.2 Visualisierung von Titin mittels Sypro Ruby**

Zur Bestimmung des Titinisoformenverhältnisses ist neben dem Imperial Protein Stain auch der sensitivere Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby geeignet. Der Anfangsschritt entsprach dem der Imperial Protein Stain Färbung.

Nach 3x Waschen mit entmineralisiertem Wasser wurde das Gel allerdings mit einer Fixierlösung für eine Stunde fixiert. Die Fixation war notwendig, da der Sypro Ruby Farbstoff nur in saurem Milieu an die Proteinbanden binden kann. Über Nacht wurde das Gel mit dem lichtempfindlichem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby auf dem Orbitalschüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Titinisoformen mittels UV – Transilluminator ausgewertet und das Isoformenverhältnis wurde densitometrisch bestimmt.

#### **2.3.6 Visualisierung des GPER30-Rezeptors in adulten männlichen Rattenkardiomyozyten**

Nach Isolation der adulten männlichen Rattenkardiomyozyten (RCMs) wurden die männlichen RCMs auf mit Laminin beschichteten Deckgläschen durch 20-minütige Inkubation einer 2%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert. PFA wurde durch phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) ersetzt und die RCMs wurden bis zur Verwendung bei 5 °C gelagert. Zur Detektion der membranständigen GPER30 –Rezeptoren über den C – Terminus wurden die Zellen mit 0,3 % - in PBS Puffer verdünnten - Triton für 30 min permeabilisiert, um für die Antikörper zugänglich gemacht zu werden.

Nach 3x Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Primärantikörper, der in einer Konzentration von 1:500 in 2% BSA in PBS verdünnt wurde, über Nacht bei 5 °C inkubiert. Nach einem erneuten 3x Waschvorgang der Zellen am nächsten Tag mit PBS wurde der Fluoreszenz – gekoppelte sekundäre Antikörper, der in einer Konzentration von 1:500 in 2% BSA/PBS verdünnt wurde, hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer. Daraufhin wurden die Zellen wieder mit PBS 3x gewaschen und schließlich auf einem Objektträger fixiert.

Die Lokalisation des GPER30-Rezeptor wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (Nikon Eclipse Ti) untersucht.

### **2.3.7 Analyse der Pixelintensität des GPER30 Rezeptors**

In dem Programm Photoshop wurden die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen GPER30-Bilder der männlichen RCMs in eine einheitliche Bildgröße von 10cm Breite, 8cm Höhe, einer Auflösung von 300 Pixel/Zentimeter und in den Grau-Farbmodus umgewandelt. Ein Bereich von 10 bis 20 Sarkomeren aus 3 Zellen pro Gruppe wurde ausgewählt, ausgeschnitten und auf dem weißen Hintergrund neben der jeweiligen Zelle platziert. Im Programm Image J wurde ein Rechteck mit einer definierten Höhe von 818 Pixeln über den zu analysierenden Ausschnitt gelegt und die Pixelintensität bestimmt. Ein Diagramm mit abwechselnd hohen Peaks entstand. Die Spitzen im Diagramm entsprachen den Pixel-Intensitäten der GPER30, während die Abstände zwischen zwei GPER30 durch die Tiefpunkte zwischen zwei Peaks abgebildet wurden. Um mögliche Translokationen der GPER30 zu quantifizieren, wurde densitometrisch das Verhältnis des GPER30-Peak-Signals als Pixeldichte unter der Peakkurve (AUC) bestimmt und dieses mit der Gesamtpixeldichte in Beziehung gesetzt.

### **2.3.8 Software**

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde folgende Software verwendet: Adobe Photoshop CS6; GraphPad Software Inc., Version 8.0; Image J; Microsoft Excel 2019; Microsoft Power Point 2019 und Microsoft Word 2019.

### **2.3.9 Statistische Datenanalyse**

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der erhobenen Daten wurden der Mittelwert und dessen Standardfehler von der Anzahl voneinander unabhängiger Versuche bestimmt. Die Mindestanzahl unabhängiger Versuche für eine statistische Auswertung wurde auf n=3 festgelegt.

Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Einzelvergleiche wurden mittels one-way-ANOVA durchgeführt, gefolgt von Sidaks multiplem Vergleichstest als post hoc-Test in Gewebeanalysen und Dunnetts multiplem Vergleichstest als post hoc-Test in Zellkulturexperimenten.

P-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant angesehen und sind in den Abbildungen mit einem Sternchen gekennzeichnet (\*P $<0,05$ , \*\*P $<0,01$ , \*\*\*P $<0,001$ , \*\*\*\*P $<0,0001$ ). Die Analysen wurden mit der Graph Pad Prism Software (GraphPad Software Inc, Version 8.0) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Der Einfluss von Östrogen auf die kardialen Titineigenschaften wurde in zwei experimentellen Ansätzen analysiert. Im ersten Versuchsansatz wurden nach der Sexualhormonbestimmung in den Seren adulter männlicher, weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten die relativen Expressionen der kardialen Titinisoformen untersucht. Ferner wurden die Titin Phosphorylierungsstellen S12022, S11878 und S4010, die daran beteiligten Kinasen Proteinkinase C alpha (PKC $\alpha$ ), extrazelluläre, signalregulierte Kinase ERK1/2 und Troponin I als Indikator der cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) (60, 61) analysiert, sowie eine geschlechtsspezifische Korrelation der Östrogen- und Progesteron-Serumspiegel mit den relativen Titinphosphorylierungen und Kinaseaktivitäten durchgeführt. Im Rahmen des zweiten experimentellen Ansatzes wurden männliche kultivierte adulte Rattenkardiomyozyten (ARCMs) 24 h nach Präparation mit Östrogen, dem Östrogenantagonisten Fulvestrant und der Kombination von Östrogen und Fulvestrant stimuliert. Die Ansätze unterschieden sich hinsichtlich der Stimulationsdauer sowie den Stimulationskonzentrationen. Die Veränderungen an den Titinphosphorylierungsstellen, Kinaseaktivitäten und den GPER30 wurden mit unbehandelten männlichen kultivierten ARCMs, die als Kontrollzellen fungierten und mit keiner zusätzlichen Substanz inkubiert wurden, verglichen.

#### 3.1 Sexualhormonbestimmung in adulten Ratten

Um die geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Geschlechtshormonhäufigkeit bei adulten Ratten zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von 17 $\beta$ -Östradiol (Östrogen/ E2) und Progesteron in Blutserumproben von adulten männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Wistar Ratten am 18. Schwangerschaftstag analysiert (vgl. Tab. 1). Bei männlichen Ratten lagen die Konzentrationen beider Geschlechtshormone unter der Nachweisgrenze (n.d.). Während die 17 $\beta$ -Östradiolspiegel bei trächtigen und nicht trächtigen weiblichen Ratten vergleichbar waren, waren die Progesteron-Serumspiegel bei trächtigen Ratten signifikant auf 33,09 ng/ml erhöht, verglichen mit 7,02 ng/ml bei nicht trächtigen weiblichen Ratten (P = 0,004).

Tab. 10: Sexualhormonbestimmung von 17 $\beta$ -Östradiol und Progesteron in adulten Ratten

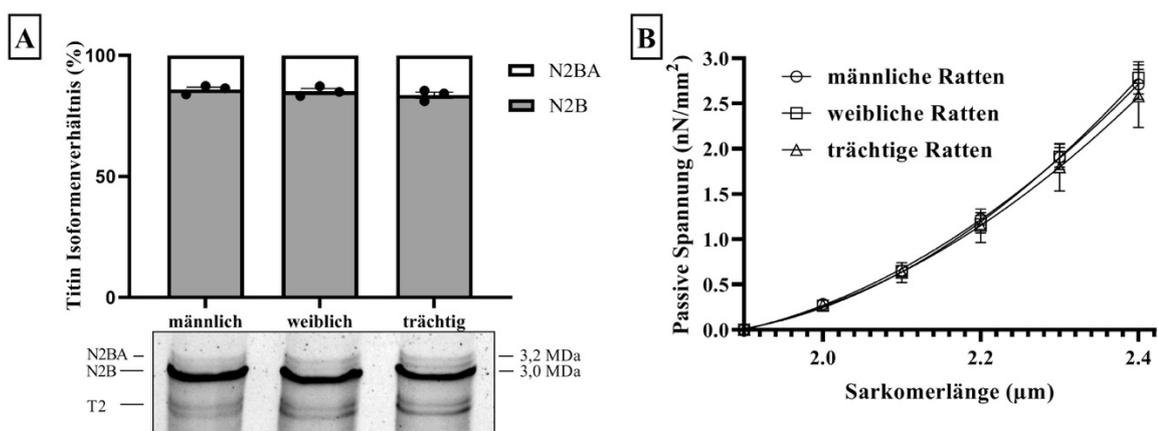
	Weibliche Ratten (n = 6)	Trächtige Ratten (n = 5)	Männliche Ratten (n = 6)
17 $\beta$ -Östradiol [pg/ml]	17.67 $\pm$ 4.14	25.40 $\pm$ 2.42	n.d.
Progesteron [ng/ml]	7.02 $\pm$ 0.96	33.09 $\pm$ 3.48 **	n.d.

Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar, Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede im Student's t-Test an (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01). n.d., nicht detektierbar.

## 3.2 Gewebeanalyse des linken Ventrikels

### 3.2.1 Geschlechtsspezifische Titinisoformenzusammensetzung

Veränderungen in der Zusammensetzung der kardialen Titinisoformen modulieren die passive Steifigkeit des Herzens und beeinflussen dessen diastolische Funktion (62). Mittels Cypro Ruby angefärbten 2,2% SDS-PAGE Gelen wurden die geschlechtsspezifischen Titinisoformenzusammensetzungen von linken Ventrikeln der männlichen, der weiblichen nicht trächtigen und der trächtigen Ratten bestimmt. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden zeigte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede mit einer N2B-Titinfraktion von  $85,9 \pm 1,0\%$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) bei männlichen Ratten,  $85,2 \pm 1,2\%$  bei weiblichen Ratten und  $83,6 \pm 1,3\%$  bei trächtigen Ratten (Abb 12A). Um zu überprüfen, ob die Kardiomyozyten der unterschiedlichen Geschlechter Abweichungen in der zellulären Steifigkeit aufweisen, wurden von Dr. Sebastian Kötter passive Kraftmessungen an Kardiomyozyten adulter männlicher, weiblicher nicht trächtiger und weiblicher trächtiger Ratten durchgeführt. Für die Messungen der passiven Steifigkeit wurden Rattenkardiomyozyten aus tiefgefrorenem Gewebe isoliert und anschließend permeabilisiert (63). Für die Messung der passiven Kräfte wurden die Zellen zunächst in calciumfreier Lösung auf einem Deckgläschen unter einem Mikroskop (Nikon Eclipse Ti) platziert und anschließend zwischen einem Längengeber und einem Kraftaufnehmer befestigt. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurde die Sarkomerlänge verfolgt. Jede Zelle wurde auf eine Ruhesarkomerlänge von  $1,9 \mu\text{m}$  eingestellt und im Anschluss in 5 Stufen auf etwa  $2,4 \mu\text{m}$  Sarkomerlänge gedehnt. Für jede Stufe wurden die jeweiligen passiven Kräfte gemessen und anschließend auf die Querschnittsfläche der Zelle bezogen (passive Kraft/Querschnitt = Passive Spannung). Insgesamt zeigten Kardiomyozyten adulter männlicher, weiblicher nicht trächtiger und weiblicher trächtiger Ratten ähnliche passive Kraftentwicklungen bei zunehmender Sarkomerlänge (Abb. 12B).



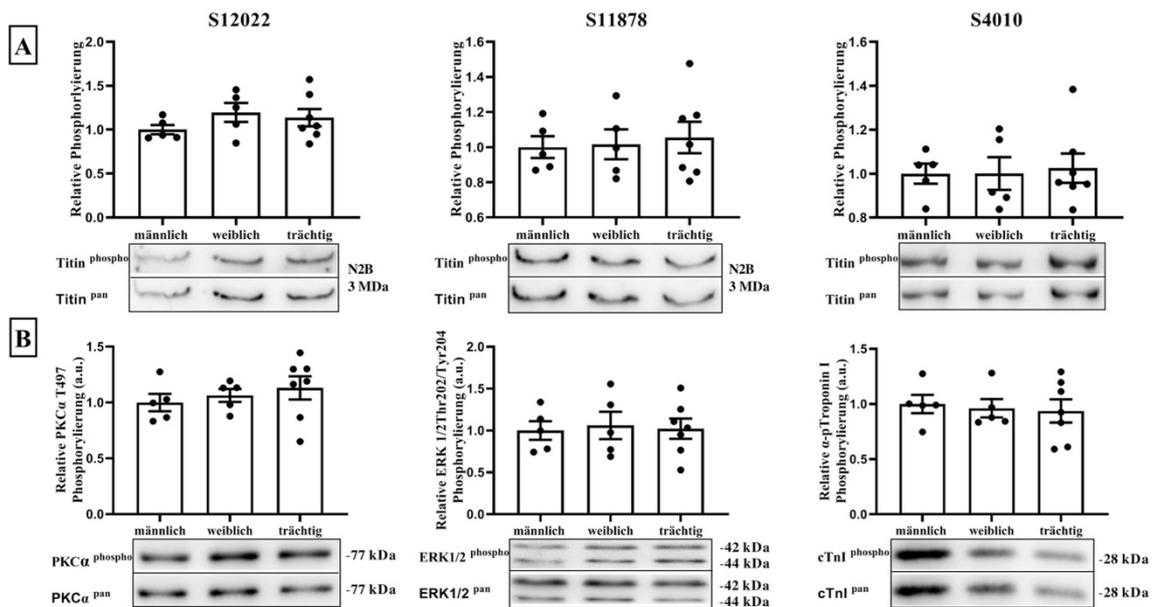
**Abbildung 12: Kardiale Titin-Eigenschaften bei männlichen, weiblichen und trächtigen Ratten.** Die Titin-Isoform-Zusammensetzung (N2BA + N2B = 100%) wurde mit Hilfe von Sypro Ruby gefärbter Agarose-stabilisierter SDS-PAGE von linksventrikulären (LV) Proben von Herzen männlicher (n = 3), weiblicher (n = 3) und trächtiger (n = 3) Ratten analysiert. Ein repräsentatives Bild ist unter den Balkendiagrammen (A) dargestellt. Passive Spannung im Verhältnis zur Sarkomerlänge von isolierten, permeabilisierten Kardiomyozyten von männlichen (n = 5 Gewebe, weiße Kreise), weiblichen (n = 6 Gewebe, weißes Quadrat)

und schwangeren (n = 5 Gewebeproben, weißes Dreieck) Ratten (B). Für jedes Gewebe wurden 3-6 Kardiomyozyten analysiert. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die Linien stellen polynomiale Anpassungen an die Daten dar. Repräsentative Bilder der Blots sind unterhalb der Balkendiagramme gezeigt. Statistische Signifikanz ist durch Sternchen gekennzeichnet (\* $P < 0,05$ ) in one-way ANOVA mit Sidak's multiplen Vergleichstest.

### 3.2.2 Geschlechtsspezifische Veränderungen der Phosphorylierung von elastischen Titindomänen und Kinaseaktivitäten

Um zu testen, ob Titin durch eine veränderte Phosphorylierung der elastischen Titin-I-Band-Domänen modifiziert ist, wurde die relative Titin-Domänen-Phosphorylierung mit spezifischen Antikörpern untersucht, die an die phosphorylierten Reste S4010 in der N2-Bus (phosphoryliert durch ERK1/2 und PKA) und S11878 und S12022 in der PEVK-Region (phosphoryliert durch PKC $\alpha$ ) binden (30). Die Bandenintensitäten wurden auf das Signal eines nicht-phosphorylierungsspezifischen Antikörpers gegen Titin normiert. In den relativen Phosphorylierungen der Phosphorylierungsstellen der PEVK- sowie der N2Bus Regionen konnten erneut keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Innerhalb der PEVK-Region wurden in der Phosphorylierungsstelle S12022 von Herzgewebe weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten leichte Tendenzen erhöhter relativer Phosphorylierungen verglichen mit männlichen Kontrollgewebe beobachtet. An der Phosphorylierungsstelle S12022 zeigte das Gewebe weiblicher nicht trächtiger Ratten einen Anstieg der relativen Phosphorylierung um  $19,6 \pm 10,9\%$ , das Gewebe trächtiger Ratten einen Anstieg um  $13,6 \pm 9,8\%$  gegenüber männlichen Kontrollen. Statistisch signifikante Veränderungen in den Phosphorylierungen von S11878 und S4010 zwischen männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten blieben aus (Abb. 13A) .

Auch die Phosphorylierungen von T497 von PKC $\alpha$ , als Indikator für die Aktivierung von PKC $\alpha$  (64) sowie der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK 1/2) als auch von Troponin I als Ziel der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase G (PKG) (60, 61) wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, was auf vergleichbare Grundaktivitäten der Kinasen im linken Ventrikel von männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten hindeutet. Die Daten präsentierten in der relativen PKC $\alpha$ -Phosphorylierung leichte Anstiege um  $6,4 \pm 5,8\%$  in weiblichen nicht trächtigen und um  $13,1 \pm 10,5\%$  in trächtigen Rattenherzen. Relative Troponin I-Phosphorylierungen in weiblichen nicht trächtigen und trächtigen linken Ventrikeln zeigten einen gegenteiligen Effekt verglichen mit den Phosphorylierungsanstiegen der relativen PKC $\alpha$ -Phosphorylierung mit leichten Abnahmen um  $3,9 \pm 8,3\%$  und  $6,3 \pm 10,5\%$  (Abb. 13B).

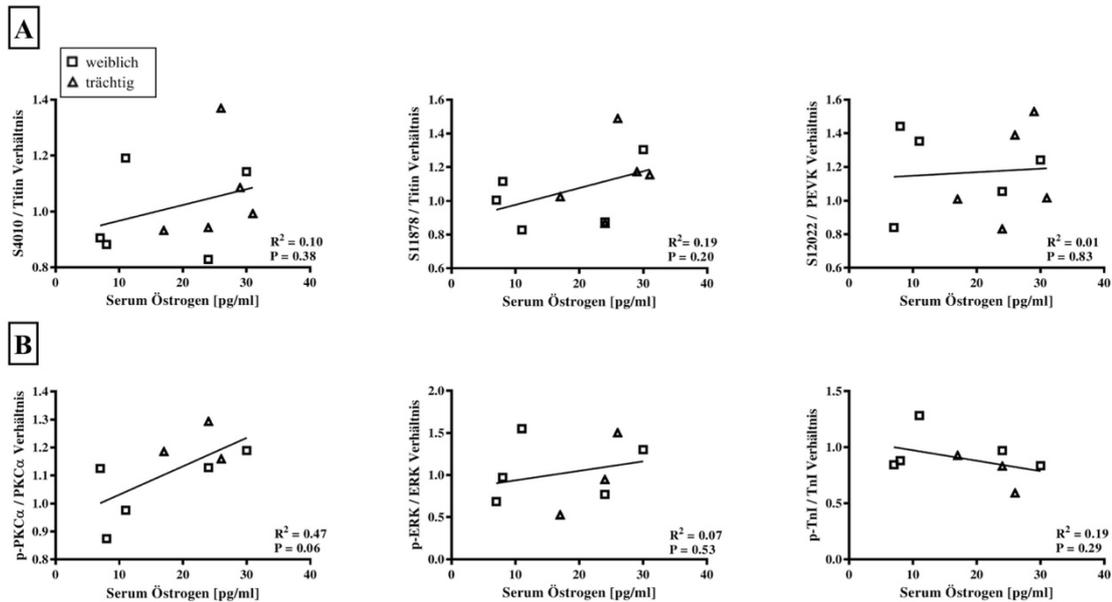


**Abbildung 13: Relative Titin-Domänen und Proteinkinase-Phosphorylierung in LV von weiblichen und trächtigen Rattenherzen im Vergleich zu männlichen Kontrollen.** Western-Blot-Analysen von  $n \geq 5$  kardialen Gewebeproben aus männlichen (Kontrolle), weiblichen Rattenherzen und Herzen trächtiger Ratten. Die Membranen wurden mit Antikörpern inkubiert, die (A) pS12022, (B) pS11878 in der PEVK - Region und pS4010 im N2-Bus (C) erkennen. Die Signale wurden auf das Gesamttitin normalisiert (Titin pan). Relative Phosphorylierungsgrade von (D) PKC $\alpha$  an T497, (E) ERK1/2 T202/Y204 und kardialem Protein I S23/24 (F). Die Signale wurden normalisiert auf PKC $\alpha$  pan, ERK1/2 oder Troponin I Antikörper. Die Diagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Repräsentative Bilder der Blots sind unterhalb der Balkendiagramme gezeigt. Statistische Signifikanz ist durch Sternchen gekennzeichnet (\* $P < 0,05$ ) in one-way ANOVA mit Sidak's multiplem Vergleichstest.

### 3.2.3 Geschlechtsspezifische Korrelation der Östrogen Serumspiegel mit den relativen Titinphosphorylierungen und Kinaseaktivitäten

Obwohl die Mittelwerte nicht statistisch signifikant verändert waren, fiel eine höhere Streuung der Einzelwerte in den weiblichen Tieren gegenüber den männlichen Tieren auf. Um zu testen, ob dies an unterschiedlichen Serum-Hormonkonzentrationen lag, wurden die individuellen Östrogen (E2)-Serumspiegel ( $n \geq 3$ ) der weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten mit den relativen Titinphosphorylierungen und den Kinase-Modifikationen korreliert. In weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten wurden keine statistisch signifikanten Korrelationen gefunden. Trächtige Ratten zeigten proportionale Werte der Titin I-Band Korrelationen (Abb. 14A). Deutliche Korrelationen wurden in den Kinasen ERK1/2 und Troponin I der trächtigen Ratten nachgewiesen. Die relativen Phosphorylierungen der ERK1/2 korrelierten mit einer positiven Steigung stark mit den E2-Serumwerten ( $R$ -Quadrat = 0,86,  $P = 0,25$ ). Eine antiproportionale Korrelation ( $R$ -Quadrat = 0,72,  $P = 0,35$ ) zeigten die Troponin I Werte (Abb. 14B). Analysen der weiblichen nicht trächtigen Ratten zeigten in den Phosphorylierungsstellen S11878 und S4010 ebenfalls proportionale Korrelationen. S12022 wies im Gegensatz zu der positiven Korrelation bei trächtigen Ratten ( $R$ -Quadrat = 0,14,  $P = 0,53$ ) keine Proportionalität bei nicht trächtigen Ratten auf ( $R$ -Quadrat = 1,6  $e^{-0,05}$ ,  $P = 0,99$ ) (Abb. 14 A). Die Korrelationen der weiblichen E2-Serumspiegel mit den Ergebnissen

der relativen Phosphorylierung der Kinasen zeigte in der PKC $\alpha$  die größte positive Steigung. Diese korrelierte deutlich besser (R-Quadrat = 0,46, P = 0,2) verglichen mit dem Ergebnis der trächtigen Ratten (R-Quadrat = 0,02, P = 0,92). Auch die E2-Troponin I Korrelation wies wie bei den trächtigen Ratten eine Antiproportionalität mit einer geringeren Korrelation auf (R-Quadrat = 0,04, P = 0,74). Die E2-ERK1/2 Korrelation zeigte bei erhöhter n-Zahl von 5 eine geringere Proportionalität (R-Quadrat = 0,03, P = 0,78) als die der trächtigen Ratten (R-Quadrat = 0,86, P = 0,25) (Abb. 14B).

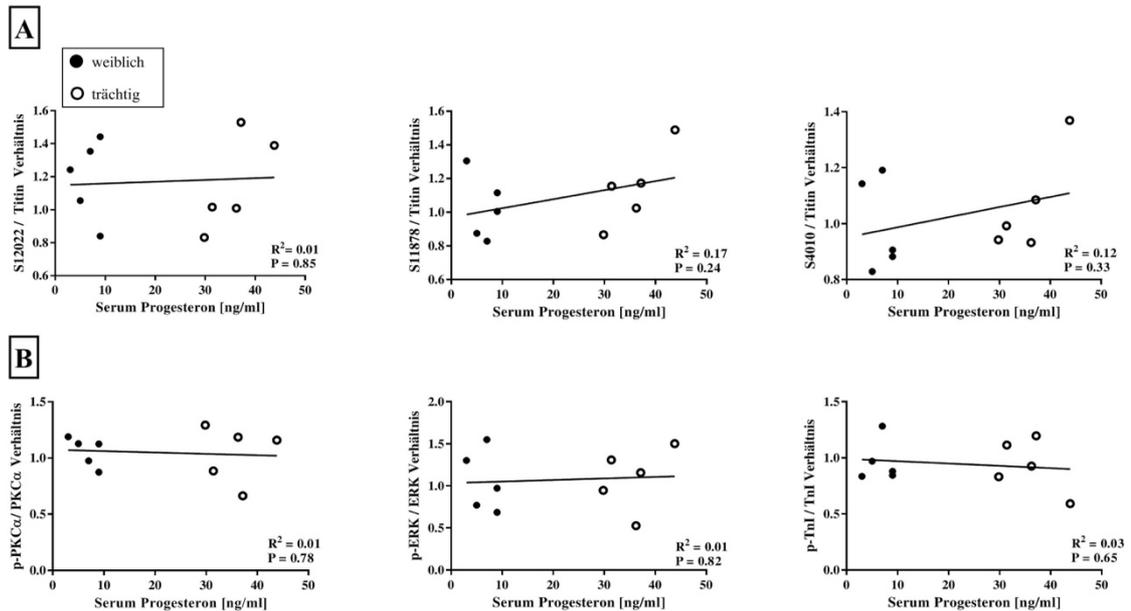


**Abbildung 14: Korrelationsanalyse der relativen Titin-Phosphorylierungen und Kinase-Aktivitäten in linksventrikulärem (LV) Gewebe weiblicher und trächtiger Ratten mit den einzelnen Serumöstrogenwerten.** Die Korrelationsergebnisse der relativen Titin-Phosphorylierungen und Kinase-Aktivitäten in LV-Gewebe weiblicher und trächtiger Ratten mit den jeweiligen Östrogenwerten sind in Einzelgraphen zusammengefasst. Die eingezeichneten Geraden korrelieren die Ergebnisse der weiblichen mit trächtigen relativen Phosphorylierungen mit Östrogen. Separate Korrelationsgeraden für ausschließlich weibliche und ausschließlich trächtige relative Phosphorylierungen mit Östrogen sind nicht dargestellt. Die Qualität der linearen Korrelation wird durch das Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup>, die Signifikanz durch den P-Wert angegeben.

### 3.2.4 Geschlechtsspezifische Korrelation der Progesteron Serumspiegel mit den relativen Titinphosphorylierungen und Kinaseaktivitäten

Die Vorgehensweise entsprach der von Kapitel 3.2.3. Die Korrelationen mit den individuellen Werten (n = 5) der Progesteron-Serumspiegel ergab keine statistischen Signifikanzen bei weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten. Trächtige Ratten zeigten stark korrelative Werte bei S12022 (R-Quadrat = 0,57, P = 0,13), S11878 (R-Quadrat = 0,74, P = 0,06) und S4010 (R-Quadrat = 0,75, P = 0,056) im Titin-I-Band (Abb. 15A). Eine Übereinstimmung einer starken Korrelation der Kinasen PKC $\alpha$  (R-Quadrat = 0,003, P = 0,93), ERK1/2 (R-Quadrat = 0,14, P = 0,54) und Troponin I (R-Quadrat = 0,24, P = 0,4) mit den Korrelationen der Titinphosphorylierungen wurde nicht gefunden (Abb. 15B). Die Phosphorylierungsstellen des I-Band Titins der weiblichen nicht trächtigen Ratten korrelierten antiproportional zu den individuellen Progesteron Werten und zeigten einen

gegenteiligen Effekt verglichen mit den Korrelationsergebnissen der trächtigen Ratten (Abb. 15A). Bis auf die Progesteron-Troponin I Korrelation ( $R$ -Quadrat = 0,002,  $P$  = 0,94) wurden die Antiproportionalitäten auch in den Kinasen PKC $\alpha$  ( $R$ -Quadrat = 0,44,  $P$  = 0,22) und ERK1/2 ( $R$ -Quadrat = 0,12,  $P$  = 0,57) gefunden (Abb. 15B). Auffallend war der deutliche Gegensatz der Korrelationsergebnisse der Titin- und Kinase Phosphorylierungsstellen zwischen weiblichen und trächtigen Ratten.



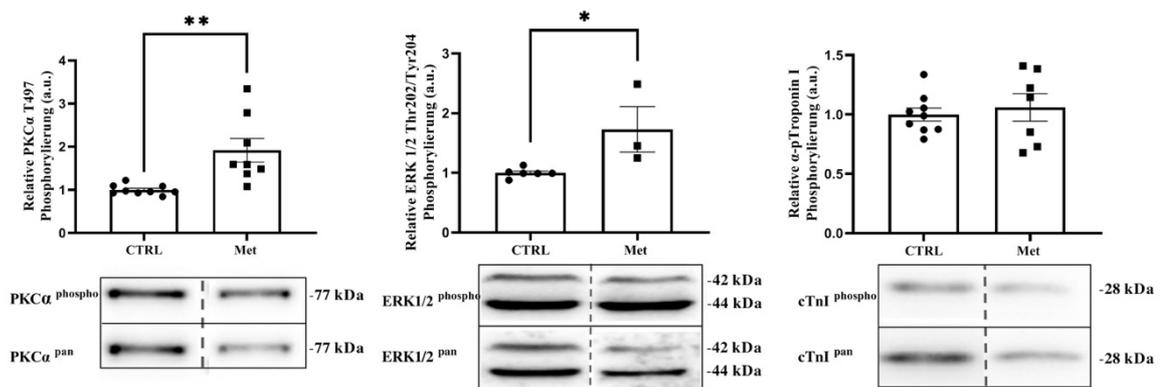
**Abbildung 15: Korrelationsanalyse der relativen Titin-Phosphorylierungen und Kinase-Aktivitäten in linksventrikulärem (LV) Gewebe weiblicher und trächtiger Ratten mit den einzelnen Serumprogesteronwerten.** Die Korrelationsergebnisse der relativen Titin-Phosphorylierungen und Kinase-Aktivitäten in LV-Gewebe weiblicher und trächtiger Ratten mit den jeweiligen Progesteronwerten sind in Einzelgraphen zusammengefasst. Die eingezeichneten Geraden korrelieren die Ergebnisse der weiblichen mit trächtigen relativen Phosphorylierungen mit Progesteron. Korrelationsgeraden für ausschließlich weibliche und ausschließlich trächtige relative Phosphorylierungen mit Progesteron sind nicht dargestellt. Die Qualität der linearen Korrelation wird durch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ , die Signifikanz durch den  $P$ -Wert dargestellt.

### 3.3 Hormonstimulationstests

#### 3.3.1 Nachweis der Aktivierung der PKC $\alpha$ - und ERK1/2 Kinaseaktivitäten mittels Positivkontrolle Metformin

Um die Aktivierung der an den zu untersuchenden Signalwegen beteiligten Kinasen nachzuweisen, wurden isolierte RCMs mit Metformin stimuliert. Metformin ist ein Antidiabetikum, dessen Auswirkungen auf Kardiomyozyten in verschiedenen Studien untersucht wurde. Stimulationsversuche mit Metformin an adulten diabetischen RCMs zeigen statistisch signifikante Aktivierungen relativer Phosphorylierungen der Kinasen PKC $\alpha$  und ERK1/2 (65). Statistisch signifikante Veränderungen der relativen Phosphorylierung des Troponin I an Ser23/24 bleiben aus (66). Zur Verifizierung der Aktivierungen der zu untersuchenden Kinasen PKC $\alpha$ , ERK1/2 und Troponin I wurden vor Einsatz des Hormons 17- $\beta$  Estradiol (E2) und dem Östrogenantagonisten Fulvestrant isolierte männliche ARCMs mit Metformin (10mM) für 1h inkubiert. Metformin-stimulierte Zellen zeigten in der

relativen PKC $\alpha$  Phosphorylierung einen um  $91,84 \pm 26,11\%$  signifikanten Anstieg verglichen mit nicht stimulierten Zellen ( $P=0,003$ ). Der gleiche Effekt wurde bei der relativen Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet. Die relative Phosphorylierung ist bei Metformin-stimulierten Zellen um  $73,03 \pm 25,44\%$  signifikant gegenüber den Kontrollzellen erhöht ( $P=0,024$ ). Die relative Troponin I Phosphorylierung an Ser23/24 wies bei den stimulierten Zellen keinen Unterschied zu den Kontrollen auf (Abb. 16).



**Abbildung 16: Analyse der Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit (Met, 10 mM) oder ohne (Ctrl = Kontrolle) Metformin für 1h.** Densitometrische Analysen von Western Blots zur Prüfung der relativen Phosphorylierung von PKC $\alpha$  an T497, ERK1/2 an T202/Y204 und kardialem Troponin I (cTnI) an S23/24. Die Phosphosignale wurden auf das jeweilige Signal der Antikörper gegen PKC $\alpha$  pan, ERK1/2 oder cTnI normalisiert. Repräsentative Bilder der Blots sind unterhalb der Balkendiagramme gezeigt. Die Grafiken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3-9 einzelnen Zellpräparationen und Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ) in ungepartem Vergleichstest.

### 3.3.2 Keine statistisch signifikanten Veränderungen der I-Band Titinphosphorylierung und daran beteiligten Kinasen nach Östrogenstimulation

An kultivierten männlichen ARCMs wurden akute östrogeninduzierte Effekte auf die Kinaseaktivitäten PKC $\alpha$ , ERK1/2, Troponin I und die relativen Phosphorylierungen im I-Band Titin S12022, S11878 und S4010 untersucht. Es wurde angenommen, dass bei gleichen ER-Leveln zwischen den Geschlechtern (21, 67) eine gesteigerte Stimulationsmenge von Östrogen in männlichen Rattenkardiomyozyten die maximale Wirkung ausüben kann. Das Zellkulturmedium wurde mit Östrogen (E2), Östrogen-Rezeptor-Inhibitor-Fulvestrant (Fulv) und einer Kombination aus beiden Stimulanzen (E2+Fulv) für eine Dauer von 30 oder 60 Minuten bei unterschiedlichen Stimulationsmengen von 10nM oder 100nM inkubiert.

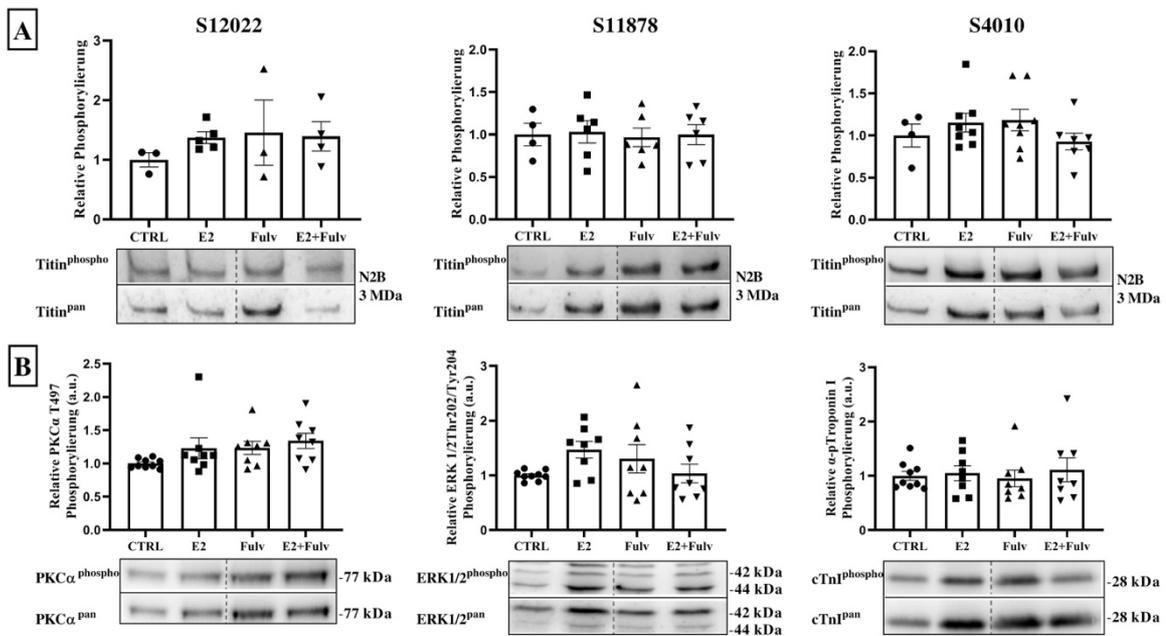
Sowohl die unterschiedliche Stimulationsdauer als auch die Stimulationsmenge erbrachten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der PTMs des Titins und den Kinaseaktivitäten nach singularer Östrogenstimulation (Abb. 17-19). Statistisch signifikante Unterschiede wurden in den Kinaseaktivitäten bei erhöhter Stimulationsmenge und reduzierter Stimulationsdauer entdeckt.

Besonders auffallend waren die statistisch signifikanten Anstiege der relativen Phosphorylierungen der Kinasen in Anwesenheit des Östrogenantagonisten Fulvestrant (Abb. 18, 19).

Im Folgendem werden die Ergebnisse der Stimulationstest hinsichtlich unterschiedlicher Stimulationsdauer und -menge detailliert zusammengefasst.

### **3.3.2.1 Ausbleibender Östrogeninduzierter Effekt auf die Titinphosphorylierungen und Kinaseaktivitäten bei geringer Stimulationsmenge**

Nach 60-minütiger Inkubation der CMs ( $n \geq 3$ ) mit 10nM E2, 10nM Fulv und der Kombination aus beiden Verbindungen wurden die östrogeninduzierten Effekte analysiert. Die Auswertung zeigte, dass E2, Fulv und E2+Fulv sowohl die Titinphosphorylierungen bei S12022, S11878 oder S4010 (Abb. 17A), als auch die PKC $\alpha$ -, ERK1/2- und die Troponin I-Phosphorylierungen (Abb. 17B) nicht signifikant veränderte. Östrogen- stimulierte Zellen zeigten in der S12022 Phosphorylierungsstelle einen um  $37,4 \pm 9,7\%$  Anstieg der relativen Phosphorylierung gegenüber Kontrollzellen (Abb. 17A), der mit einer erhöhten relativen Phosphorylierung der PKC $\alpha$  um  $22,8 \pm 15,8\%$  einherging (Abb. 17B). Der gleiche Effekt zeigte sich mit einer in der S12022 relativen Phosphorylierung um  $45,6 \pm 54,8\%$  bei Fulv- und um  $39,5 \pm 24,7\%$  bei E2+Fulv-stimulierten Zellen (Abb. 17A). Die relativen Phosphorylierungen der PKC $\alpha$  wurden um  $23,5 \pm 9,9\%$  durch Fulv- und um  $34,1 \pm 11,5\%$  durch E2+Fulv Gabe erhöht (Abb. 17B). Die relativen Phosphorylierungen von S11878, S4010 wiesen durch die Gabe von E2, Fulv und E2+Fulv keine statistisch signifikanten oder tendenziellen Veränderungen verglichen mit Kontrollzellen auf (Abb 17A). Dies ging mit unveränderten relativen Troponin I-Phosphorylierungen von stimulierten zu nicht-stimulierten Zellen einher. Ebenfalls wurden bei stimulierten Zellen keine statistisch signifikanten Veränderungen der relativen ERK1/2-Phosphorylierung gefunden. E2- und Fulv- stimulierte Zellen zeigten um  $47,2 \pm 15,2\%$  und  $30,4 \pm 25,9\%$  Tendenzen erhöhter relativer Phosphorylierungen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 17B). Ein Effekt bei kombinierter Gabe mit Östrogen und Fulvestrant blieb aus. Auffallend war die hohe Varianz der Einzelwerte der stimulierten Versuchsansätze im Gegensatz zu den Kontrollen.

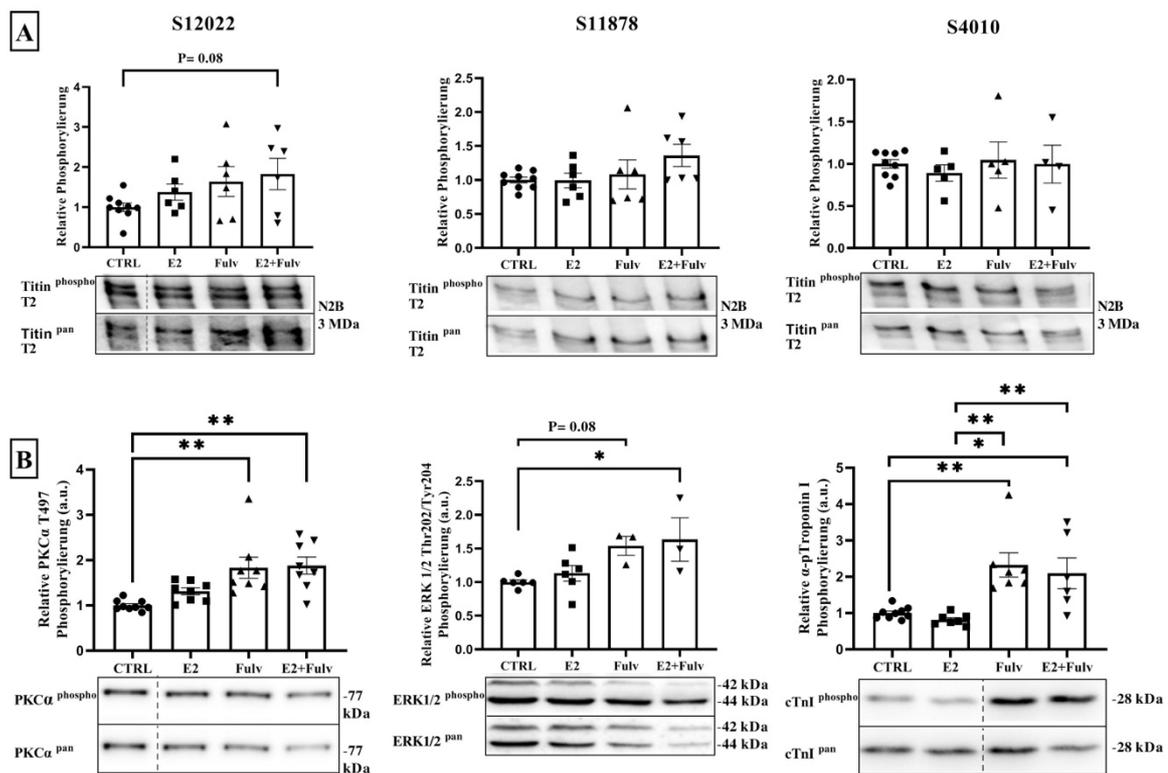


**Abbildung 17: Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung und Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Östrogen (E2, 10nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (Fulv, 10nM) oder isotonischem Puffer (Ctrl = Kontrolle) für 1h.** Densitometrische Analysen von Western Blots zur Prüfung der relativen Titindomänen-Phosphorylierung an S12022, S11878 und S4010 (A) sowie der relativen Phosphorylierung von PKC $\alpha$  an T497, ERK1/2 an T202/Y204 und kardialen Troponin I (cTnI) an S23/24 (B). Die Phosphosignale wurden auf das jeweilige Signal der Antikörper gegen Gesamttitin, PKC $\alpha$  pan, ERK1/2 oder cTnI normalisiert. Repräsentative Bilder der Blots sind unterhalb der Balkendiagramme gezeigt. Die Grafiken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3-8 einzelnen Zellpräparationen und Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\* $P < 0,05$ ) in one-way ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest.

### 3.3.2.2 Verstärkung der schnellen nicht-genomischen GPER30-vermittelten Signaltransduktion durch Östrogen-Rezeptor-Hemmung mit Fulvestrant

Um Auswirkungen höherer Konzentrationen der Stimulanzien auf die Ergebnisse aus 3.3.2.1 zu untersuchen, wurden isolierte männliche ARCMs mit der 10-fachen Menge (100nM) bei gleichbleibender Stimulationszeit inkubiert und anschließend geerntet. Die Daten zeigten erneut keine statistisch signifikanten östrogeninduzierten Effekte auf die PEVK- und die N2B<sub>US</sub>-Regionen (Abb. 18A). Auch die Kinaseaktivitäten veränderten sich durch die Östrogenstimulation nicht signifikant gegenüber den Kontrollen (Abb. 18B). Auffallend war ein deutlicher Anstieg der relativen Phosphorylierung der S12022 bei stimulierten Zellen im Vergleich zu Kontrollen. Durch E2- Applikation stieg die relative Phosphorylierung um  $37,7 \pm 20,1\%$ , bei Fulv-stimulierten Zellen um  $64,2 \pm 37,3\%$  und bei E2 + Fulv Kombination um  $83 \pm 39,3\%$ . Die relative Phosphorylierung bei S11878 erhöhte sich bei kombinierter Gabe von E2+Fulv um  $36,2 \pm 16,3\%$ , blieb aber bei nicht kombinierter Gabe unbeeinflusst. Die Phosphorylierungslevel der S4010 zeigten zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen keine statistisch signifikanten Veränderungen oder Trends (Abb. 18A). Anstiege der relativen Phosphorylierungen der stimulierten Zellen ließen sich ebenfalls in den PKC $\alpha$ - und ERK1/2-Phosphorylierungen nachweisen. Fulv und E2+ Fulv erhöhten die relative Phosphorylierung der PKC $\alpha$  um  $83,1 \pm 23,4\%$  ( $P=0,003$ ) und  $87,9 \pm 18,7\%$  ( $P=0,001$ )

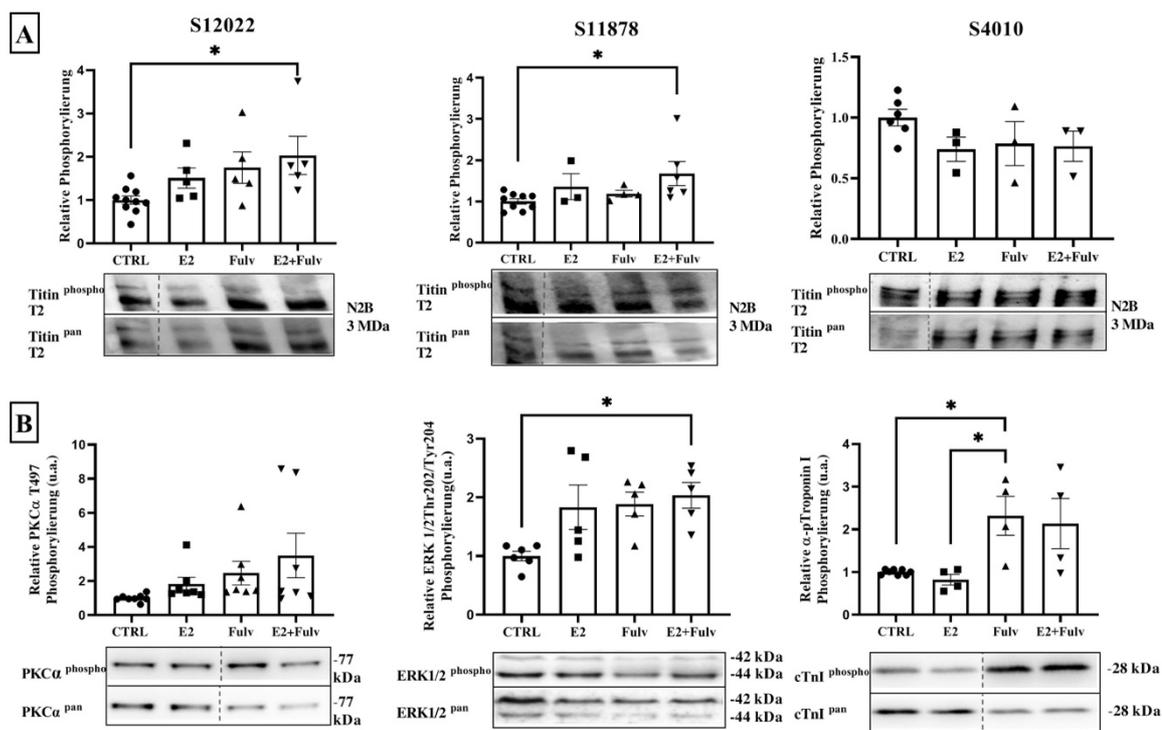
signifikant. E2-stimulierte Zellen zeigten einen erhöhten relativen Phosphorylierungsanstieg um  $31,2 \pm 7,6\%$ . Die relative ERK1/2-Phosphorylierung zeigte bei Fulv-stimulierten Zellen einen Anstieg um  $54,0 \pm 14,1\%$  mit einem P-Wert von 0,082. Ein signifikanter Anstieg in der relativen ERK1/2 Phosphorylierung um  $63,5 \pm 32,3\%$  zeigten die ARCM bei E2+Fulv Gabe ( $P=0,035$ ). Ausgeprägte Veränderungen bei E2-stimulierten Zellen blieben aus (Abb. 18B). Deutliche Veränderungen zeigten sich in der relativen Phosphorylierung von Troponin I verglichen mit den Ergebnissen aus 3.3.2.1. Die Gabe des Antagonisten Fulv steigerte die relative Troponin I-Phosphorylierung signifikant um  $132,4 \pm 33,3\%$  gegenüber Kontrollzellen ( $P=0,002$ ), gegenüber E2-stimulierten Zellen erhöhte sich die Phosphorylierung signifikant um  $150,8 \pm 33,3\%$  ( $P=0,001$ ). Die Kombinationsgabe von E2 + Fulv ergab eine signifikante Steigerung von  $109,4 \pm 42,4\%$  gegenüber Kontrollzellen ( $P=0,018$ ) und von  $127,8 \pm 42,4\%$  gegenüber E2-stimulierten Zellen ( $P=0,008$ ). Die Daten wiesen eine um  $18,4 \pm 5,8\%$  Abnahme der relativen Troponin I-Phosphorylierungen bei E2-stimulierten Zellen nach. Die Varianz der Einzelwerte war im Vergleich zu der aus 3.3.2.1. etwas geringer, insgesamt immer noch hoch.



**Abbildung 18: Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung und Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Östrogen (E2, 100nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (Fulv, 100nM) oder isotonischem Puffer (Ctrl = Kontrolle) für 1h.** Densitometrische Analysen von Western Blots zur Prüfung der relativen Titindomänen-Phosphorylierung an S12022, S11878 und S4010 (A) sowie der relativen Phosphorylierung von PKC $\alpha$  an T497, ERK1/2 an T202/Y204 und kardialen Troponin I (cTnI) an S23/24 (B). Die Phosphosignale wurden auf das jeweilige Signal der Antikörper gegen Gesamttitin, PKC $\alpha$  pan, ERK1/2 oder cTnI normalisiert. Repräsentative Bilder der Blots sind unterhalb der Balkendiagramme gezeigt. Die Grafiken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3-8 einzelnen Zellpräparationen und Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ) in one-way ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest.

### 3.3.2.3 Verstärkung der östrogeninduzierten schnellen nicht-genomischen GPER30-Effekte bei reduzierter Stimulationsdauer

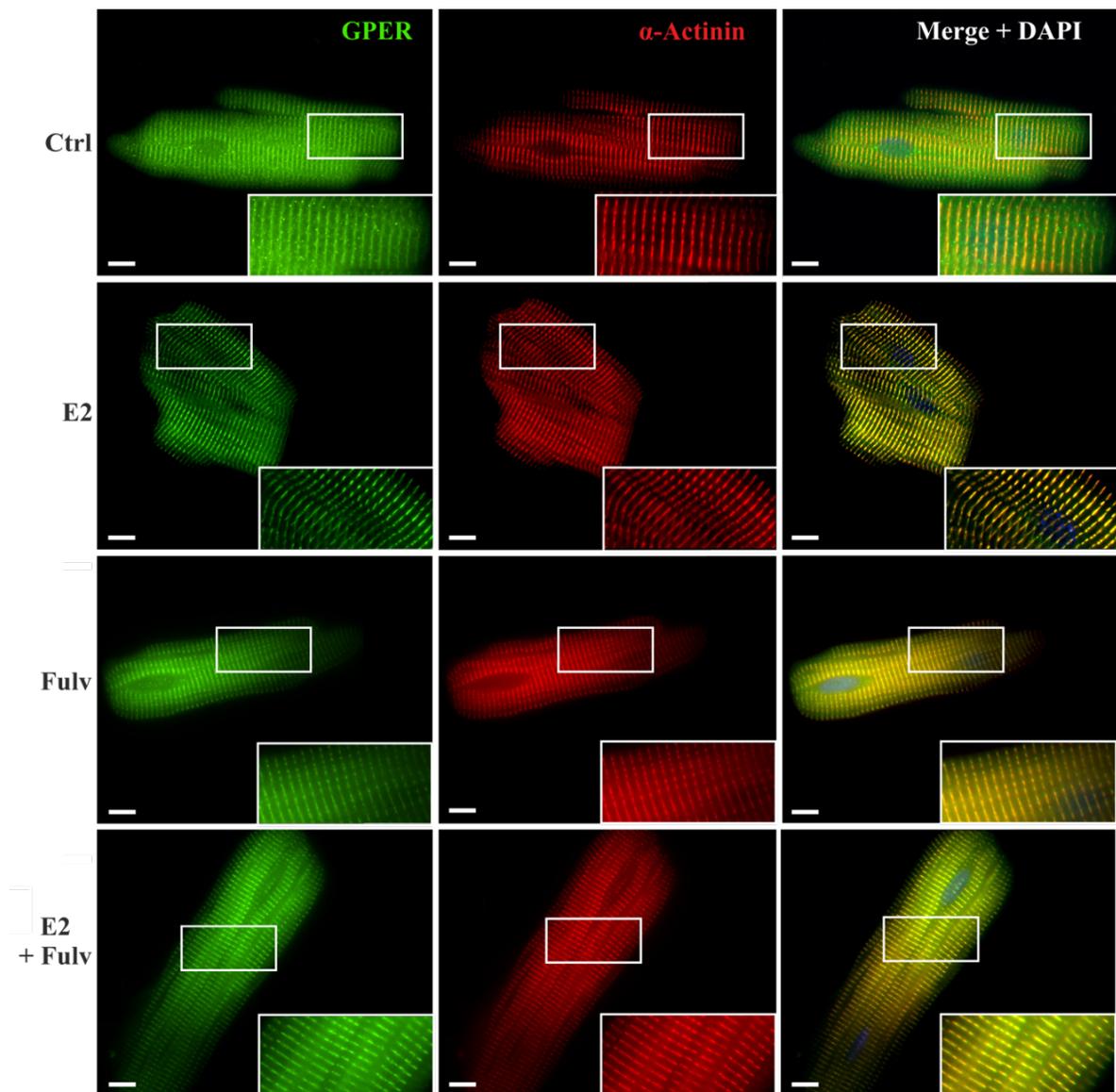
Um die zeitliche Komponente zu erfassen, wurde im dritten experimentellen Ansatz die Stimulationszeit auf 30 Minuten bei 10-facher Hormonstimulation (100nM) von 3.3.2.2 festgelegt. Weder in den Phosphorylierungsstellen S12022, S11878 und S4010 (Abb. 19A), noch in den Kinaseaktivitäten PKC $\alpha$ , ERK1/2 und Troponin I (Abb. 19B) wurden signifikante Veränderungen nach Östrogenapplikation festgestellt. Die Auswertungen beschrieben wie in den Kapiteln 3.3.2.1 und 3.3.2.2 einen Anstieg der relativen Phosphorylierung in S12022 von stimulierten Zellen mit deutlichen Anstiegen in E2- und Fulv-stimulierten Zellen um  $51,1 \pm 23,2\%$  und  $75,0 \pm 36,3\%$  und einem signifikanten Maximalanstieg bei E2+Fulv-stimulierten Zellen um  $103,2 \pm 44,2\%$  im Vergleich zu Kontrollen ( $P=0,034$ ). Das Ergebnis der relativen Phosphorylierung von S11878 ähnelte dem von Kapitel 3.3.2.2. Verglichen mit dem Ergebnis aus Kapitel 3.3.2.2. erhöhte sich bei Kombinationsgabe von E2 und Fulv die relative Phosphorylierung von S11878 signifikant um  $67,8 \pm 29,2\%$  ( $P = 0,044$ ). Die relativen Phosphorylierungen bei S4010 nahmen zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen um durchschnittlich 15% ab und wichen von den Ergebnissen aus 3.3.2.1. und 3.3.2.2. ab (Abb. 19A). Die erhöhten PKC $\alpha$ -, ERK1/2- und Troponin I-Aktivitäten waren teilweise analog zu den Ergebnissen aus 3.3.2.2. Die relative Phosphorylierung von PKC $\alpha$  war bei stimulierten Zellen mit dem Maximum bei E2 + Fulv-stimulierten Zellen um  $249,8 \pm 130,2\%$  deutlich erhöht. Auffallend war der um 50,6% Anstieg der E2-stimulierten Zellen verglichen mit den Ergebnissen aus 3.3.2.2. Die relative ERK1/2-Phosphorylierung nahm bei E2-stimulierten Zellen um  $83,2 \pm 37,9\%$ , bei Fulv-stimulierten Zellen um  $88,6 \pm 20,2\%$  und bei der Kombination von E2+Fulv signifikant um  $103,6 \pm 21,9\%$  zu ( $P=0,031$ ). Die relativen Phosphorylierungen von Troponin I zeigten Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen aus 3.3.2.2. Fulv erhöhte die relative Phosphorylierung gegenüber Kontrollen signifikant um  $131,7 \pm 45,6\%$  ( $P=0,022$ ) gegenüber E2-stimulierten Zellen um  $149,3 \pm 45,6\%$  ( $P = 0,025$ ) signifikant. Nach E2+Fulv Gabe stieg die relative Phosphorylierung deutlich gegenüber Kontrollen um  $113,6 \pm 58,9\%$  ( $p=0,053$ ) und E2-stimulierten Zellen um  $131,2 \pm 58,9\%$  an ( $P = 0,053$ ). E2-stimulierte Zellen zeigten erneut eine relative Dephosphorylierung um  $17,6\% \pm 12,4\%$  im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 19B). Auffallend war erneut die hohe Streubreite zwischen den einzelnen Proben bei stimulierten Zellen im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen.



**Abbildung 19: Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung und Kinase-Aktivitäten in kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Östrogen (E2, 100 nM), dem Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant (Fulv, 100 nM) oder isotonischem Puffer (Ctrl = Kontrolle) für 30min.** Densitometrische Analysen von Western Blots zur Prüfung der relativen Titindomänen-Phosphorylierung an S12022, S11878 und S4010 (A) sowie der relativen Phosphorylierung von PKC $\alpha$  an T497, ERK1/2 an T202/Y204 und kardialem Troponin I (cTnI) an S23/24 (B). Die Phosphosignale wurden auf das jeweilige Signal der Antikörper gegen Gesamtitin, PKC $\alpha$  pan, ERK1/2 oder cTnI normalisiert. Repräsentative Bilder der Blots sind unterhalb der Balkendiagramme gezeigt. Die Grafiken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3-8 einzelnen Zellpräparationen und Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\* $P < 0,05$ ) in one-way ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest.

### 3.3.3 Translokation von GPER30-Vesikeln in die Z-Scheiben Region von kultivierten adulten Rattenkardiomyozyten

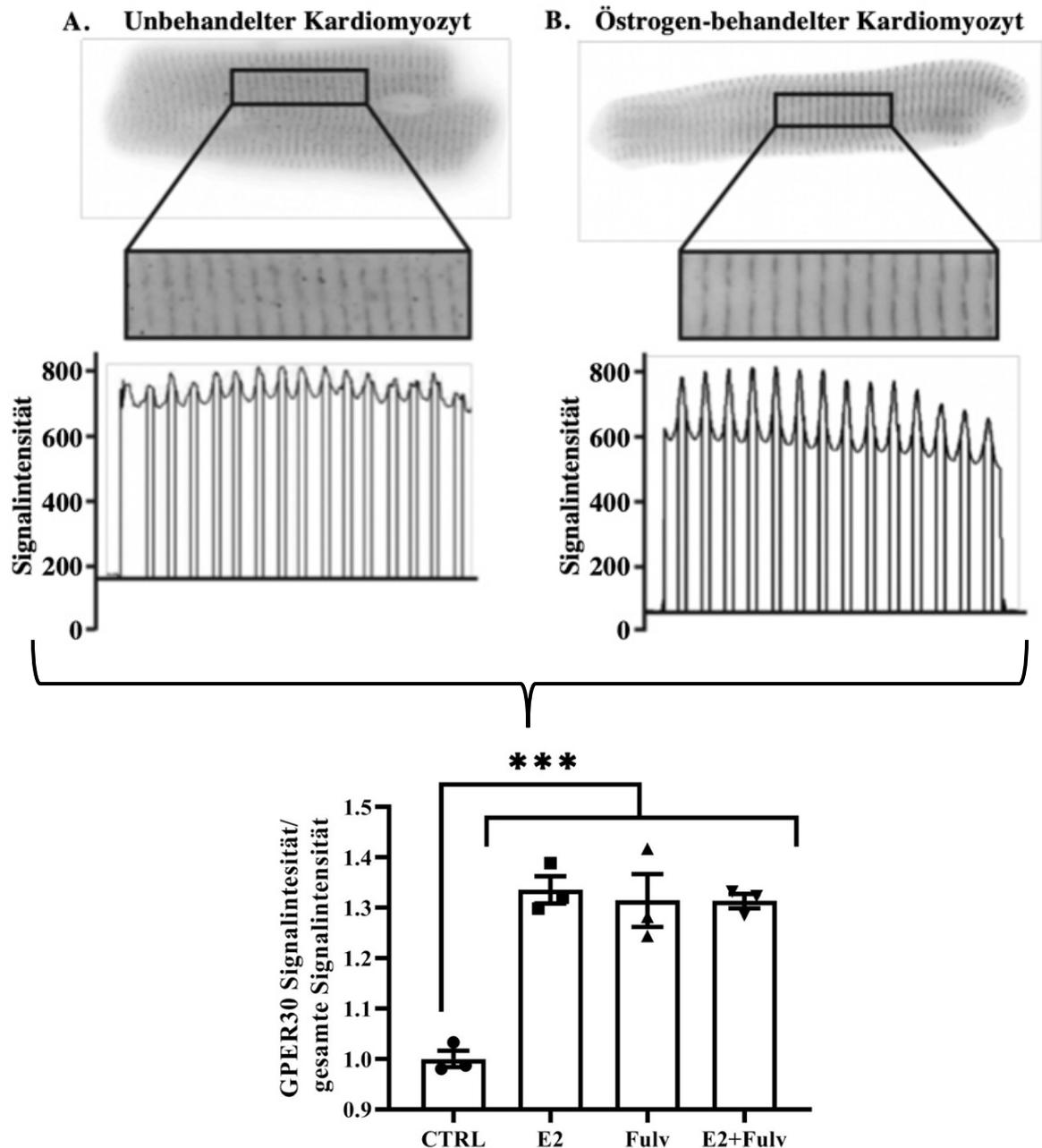
Zur Charakterisierung der GPER30-Lokalisierung wurden immunhistochemische Analysen in isolierten männlichen ARCMs durchgeführt, die mit oder ohne Zusatz von 10nM Östrogen, 10nM Fulvestrant und einer Kombination aus beiden Verbindungen kultiviert wurden. Nach einer 60-minütigen Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf die GPER30- und  $\alpha$ -Aktinin-Lokalisierung getestet. In unbehandelten Kardiomyozyten zeigten mikroskopische Analysen, dass ein großer Teil des GPER30-Signals eine punktförmige Verteilung innerhalb der Kardiomyozyten unabhängig von den myofibrillären Strukturen aufwies. Darüber hinaus kolokalisierte das GPER30-Signal mit dem regelmäßigen Muster der  $\alpha$ -Aktinin-Färbung in der Z-Scheiben-Region der Sarkomere. In Östrogen- und Fulvestrant-behandelten Kardiomyozyten kam es zu einer Reduktion dieser vesikelähnlichen Strukturen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 20).



**Abbildung 20: Lokalisierung von GPER30 im Kardiomyozyten.** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von isolierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten, die mit 10 nM 17- $\beta$ -Estradiol (E2), Fulvestrant (Fulv) oder einer Kombination aus beiden für 1h behandelt wurden. Unbehandelte Kardiomyozyten dienen als Kontrolle (Ctrl). Die Kardiomyozyten wurden für GPER30 immungefärbt (sekundärer Antikörper: Flour 488 konjugiertes IgG; linkes Panel) und gegengefärbt für  $\alpha$ -Actinin in der Z-Scheibe (sekundärer Antikörper: Flour 555 konjugiertes IgG; mittleres Panel). Rechts sind die Bilder mit zusätzlicher nukleärer DAPI-Färbung (blau) zusammengefügt. Die Einschübe zeigen das Antikörpermuster bei höherer Vergrößerung. Weiße Balken stellen 10  $\mu$ m dar.

Um die substanzbedingte Translokation des GPER30-Signals in die Z-Scheiben Region zu quantifizieren, wurden die Signalintensität und -verteilung von GPER30 in vesikelähnlichen Strukturen im Vergleich zur Signalkolokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin quantifiziert, und eine statistische Analyse durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass durch die Anwendung von Östrogen, Fulvestrant und der Kombination beider Stimulanzien die Häufigkeit der punktförmigen Verteilung des GPER30 innerhalb der Kardiomyozyten signifikant verringert und das GPER30-Signal auf die Z-Scheiben Region kondensiert wurde. Im Vergleich zu Kontrollzellen stiegen die Signale in den Z-Scheiben Regionen bei Östrogen- um  $33,5 \pm 2,7 \%$  ( $P=0,0003$ ) bei Fulvestrant- stimulierten Zellen um  $31,4 \pm$

5,2% ( $P=0,0005$ ) und bei der Kombination aus beiden Verbindungen um  $31,3 \pm 1,4 \%$  ( $P=0,0005$ ) signifikant an (Abb. 21).



**Abbildung 21: Bestimmung der Signalintensität und Signalverteilung von anti-GPER30 gefärbten kultivierten adulten männlichen Rattenkardiomyozyten mit und ohne Östrogenbehandlung.** Repräsentative Schnitte von 10 bis 20 Sarkomeren aus Immunfluoreszenzbildern, die in Graustufen umgewandelt wurden. (A) Exemplarische Analyse der Pixelintensität in unbehandelten (Kontrolle, linkes Panel) und östrogenbehandelten Kardiomyozyten, die mit anti-GPER30-Antikörpern getestet wurden (B). Statistische Analyse des Verhältnisses von GPER30-Signal zu Gesamtsignal in Kardiomyozyten, die mit 10nM Östrogen (E2), Fulvestrant (Fulv) oder einer Kombination von beiden (E2+Fulv) für 1h behandelt wurden (C). Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 Bildern pro Gruppe. Sternchen weisen auf statistisch signifikante Unterschiede ( $***P<0,001$ ) in der one-way ANOVA mit Turkey's multiplem Vergleichstest hin.

## 4. Diskussion

Das Sarkomerprotein Titin ist eine Hauptdeterminante der passiven myokardialen Steifheit. Die Modulation der Titinsteifigkeit wird mit akuten und chronischen Veränderungen der diastolischen Funktion und der anschließenden über den Frank-Starling-Mechanismus regulierten systolischen Pumpfunktion in Verbindung gebracht (30). Neue Studienergebnisse betonen die Rolle des Titins bei geschlechtsabhängigen Unterschieden der diastolischen Funktion bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie (68). Ob Titin-Veränderungen direkt vom Geschlecht und / oder vom Östrogenspiegel abhängen, war bislang noch nicht untersucht. Die Dissertation untersucht eine mögliche Veränderung der Zusammensetzung, Phosphorylierung und Funktion der Titin-Isoformen in den linken Ventrikeln adulter männlicher, weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten. Ferner wurde im Rahmen von Hormonstimulationstests untersucht, ob Östrogen die Titin-Phosphorylierung und die daran beteiligten Kinasen PKC $\alpha$ , ERK1/2 und Troponin I in isolierten männlichen adulten Rattenkardiomyozyten direkt moduliert. Zudem wurde die Lokalisation der GPER30 sowie eine mögliche Translokalisierung der GPER30 nach Hormonstimulation analysiert.

### 4.1 Unveränderte geschlechtsspezifische Titin-Isoformenzusammensetzung in adulten Ratten

Analysen der Titin-Isoformenzusammensetzung von adulten männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten lieferten keine Hinweise auf signifikante geschlechtsspezifische Veränderungen des N2BA/N2B Verhältnisses. Die durchgeführten Kraftmessungen von RCMs bei adulten männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten zeigten ebenfalls gleichbleibende passive Kraftentwicklungen bei zunehmender Sarkomerlänge ohne Hinweise auf geschlechtsspezifische signifikante Veränderungen. Die RCMs wiesen insgesamt eine hohe Expression der steifen kardialen Isoform N2B mit einem niedrigen N2BA/ N2B Verhältnis auf. Diese Daten decken sich mit vorangegangenen Analysen, die eine hohe myokardiale Steifigkeit in adulten Rattenherzen mit Expressionen von >90% N2B und <10% N2BA beschrieben (33). Ursächlich für die durch hohe Expression der steifen N2B-Isoform erhöhte Wandspannung der Herzkammern sind Adaptionen des Titin-Isoformenverhältnisses bei der Umstellung des fetalen auf den postnatalen Kreislauf. Der erhöhte gesamte postnatale Gefäßwiderstand führt zu einer Degradation der langen fetalen N2BA Isoform (3,7 MDa) und vermehrter Expression der steiferen N2B Isoform (3 MDa) (33). Durch das veränderte Isoformenverhältnis entstehen hohe kardiale Rückstellkräfte, die die diastolische Relaxation bei hoher Herzfrequenz der Ratten unterstützen (31).

Interessant ist das Ausbleiben einer Veränderung der Zusammensetzung der Titin-Isoformen bei trächtigen Ratten trotz der Ausbildung des fetalen Kreislaufs. Der sich in trächtigen Ratten ausbildende fetale Kreislauf schließt sich über die plazentäre Zirkulation dem Körperkreislauf direkt an (69). Er ist dem mütterlichen Körperkreislauf folglich in Reihe geschaltet. Es stellt sich daher die

Frage nach einer Mehrbelastung des linken Ventrikels aufgrund der Addition der Einzelwiderstände von Körperkreislauf und fetalem Kreislauf. Obwohl eine normale Schwangerschaft durch eine 40%ige Zunahme des Blut- und Plasmavolumens sowie des Herzzeitvolumens gekennzeichnet ist (70, 71), was ferner für eine Mehrarbeit und die schwangerschaftsinduzierte kardiale Hypertrophie spricht (68), zeigen Daten, dass der arterielle Blutdruck leicht reduziert wird, und damit auch der periphere Gesamtwiderstand abnimmt (70, 71). Die ursprüngliche Erklärung, dass der uteroplazentäre Kreislauf, der als Shunt mit geringem Widerstand wirkt, dieses hämodynamische Profil bedingt (72), wird durch neue Erklärungsansätze ersetzt. So kommt es während der gesamten Schwangerschaft zu einer verminderten vaskulären Ansprechbarkeit auf die meisten zirkulierenden Vasokonstriktoren (72-74). Zusätzlich sind autonome Kontrollmechanismen über Baroreflex-Sympathikus-Hemmung innerhalb der rostralen ventralen lateralen Medulla (RVLM) des Hirnstamms durch den inhibitorischen Aminosäuretransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) verändert (75). Stumpf (1990) betonte die Rolle der Ovarialhormone bei der kardiovaskulären Steuerung durch autoradiographische und biochemische Studien mit Gewebehomogenaten, die das Vorhandensein einer nukleären Rezeptorbindung von Östradiol und Progesteron in Neuronen im Hirnstamm zeigten (76). Eine Erhöhung der Anzahl der Bindungsstellen für GABA in verschiedenen Hirnregionen, die mit der GABAergen Übertragung assoziiert sind, wurde durch eine Vorbehandlung mit Östrogen und Progesteron gezeigt (77). Die Sexualhormone, vor allem der physiologische Anstieg der Progesteron-Werte verstärken sympathiko-inhibierende Wirkungen der GABAA-Rezeptoraktivierung in der RVLM (75). Die unveränderten Kreislaufverhältnisse während der Schwangerschaft geben einen möglichen Erklärungsansatz für das Ausbleiben von Langzeitveränderung der Isoformenzusammensetzung des kardialen Titins. Studien analysierten den kardialen Hypertrophie-Signalweg im Rahmen der physiologisch stattfindenden schwangerschaftsinduzierten Hypertrophie. Es konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Östrogenspiegel in der Spätschwangerschaft eine Herabregulierung des Kv4.3-Proteins und eine erhöhte Aktivität der durch Dehnung aktivierten c-Src-Kinase bewirkt. Die darauffolgende Aktivierung schneller Signalwege wie den Ras/Raf/MAPK-Signalweg führte zu einer kardialen Hypertrophie während der Schwangerschaft. Spleißvorgänge, die einen Titinisoformenswitch bewirken, wurden allerdings nicht beschrieben (78). RBM20 führt über alternative Spleißvorgänge im Herzen zur Expression steiferer N2B Isoformen. Dies bestätigten Experimente bei denen eine hohe Konzentration an mittelgroßen N2BA (N2BA:N2B = ~60:40) Isoformen bei heterozygoten RBM20-Knockout-Ratten (KO) gefunden wurden, während bei homozygoten RBM20-KO-Ratten nur die große N2BA-G-Isoform exprimiert wurde (79). Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Serumanalysen der Schilddrüsenhormone trächtiger Ratten, die über den PI3-AKT-mTOR-Kinase-Signalweg Auswirkungen auf die RBM20 haben (30, 80), ergaben eine euthyreote Stoffwechsellage. RBM20 scheint somit nicht aktiviert zu werden, da das Isoformenverhältnis von weiblichen nicht trächtigen zu trächtigen Ratten unverändert geblieben ist.

## 4.2 Ausbleiben geschlechtsspezifischer akuter Modifikation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit

Aufgrund gleicher Titin-Isoformenverhältnisse zwischen männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten, wurden akute Modifikation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit untersucht. Die durchgeführten Versuche ergaben keine signifikanten Veränderungen im elastischen Titin I-Band. Der Anstieg der relativen Phosphorylierung der S12022 innerhalb der PEVK-Region in RCMs weiblicher und trächtiger Ratten verglichen mit männlichen Kontrollzellen bei gleichbleibenden Werten von S11878 und S4010 geht mit einer funktionellen Erhöhung der myokardialen Steifigkeit einher (33). Der Anstieg der relativen Phosphorylierung könnte ein Hinweis auf den Einfluss des weiblichen Sexualhormones Östrogen sein. Die erhöhte Varianz der relativen Phosphorylierung bei weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten verglichen mit männlichen Kontrollen verstärken diese Hypothese. Analysen der Östradiolwerte innerhalb eines 4-tägigen Zyklus von jungen Ratten des Sprague/Dawley-Stammes im Alter von 3-4 Monaten zeigten typische Schwankungen des Sexualhormons mit signifikantem Anstieg im Proöstrus (81) bei physiologischen 17 $\beta$ -Östradiolwerten von 5-140 pg/mL im Serum an (82). Auch die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Serumanalysen der 6-8 Wochen alten weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Wistar-Ratten wiesen eine hohe Schwankungsbreite der 17 $\beta$ -Östradiolwerte auf mit einer maximalen Differenz von 23 pg/ml bei weiblichen nicht trächtigen und 14 pg/ml bei trächtigen Ratten ohne Differenzierung der Östradiolwerte in die einzelnen Zyklusphasen. Die interindividuellen Unterschiede geben einen möglichen Erklärungsansatz für die erhöhte Streuung der Einzelwerte bei weiblichen nicht trächtigen und trächtigen verglichen mit männlichen Ratten, bei denen die Östrogene unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Die erhöhte Varianz relativer Phosphorylierungswerte der RCMs weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten wurde neben der zu untersuchten Phosphorylierungsstelle S12022 auch in den Phosphorylierungsstellen S11878 und S4010 sowie den Kinasen PKC $\alpha$ , ERK1/2 und Troponin I beobachtet. Eine Phosphorylierung der Titin PEVK-Region an den Serinresten S12022 und S11878 kann durch die Calcium-abhängige Proteinkinase PKC $\alpha$  erfolgen (30, 80). Die RCMs weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten zeigten in der vorliegenden Arbeit jedoch eine unveränderte bis minimal gesteigerte PKC $\alpha$ -Aktivität im Vergleich zu Kontrollen. Ein statistisch signifikanter Anstieg in der Phosphorylierung bzw. Aktivierung der Kinase, der die Modifikation des Serinrestes S12022 erklären würde, blieb allerdings aus. Ebenfalls wurde kein Anstieg der PKC-alpha-abhängigen Phosphorylierung des Serinrestes S11878 beobachtet. Eine Phosphorylierung der Serinreste S12022 und S11878 wurde zudem auch für die CaMKII nachgewiesen (30, 80) (83). Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Phosphorylierungsanstiege der S12022 und S11878 detektiert. Eine erhöhte CaMKII $\delta$ -Aktivität geht mit einer Erhöhung der relativen Phosphorylierung der N2B $\alpha$ s an Positionen S4062/4043 einher. Eine Phosphorylierung des Serinrestes S4010 durch die CaMKII $\delta$  scheint physiologisch eher unwahrscheinlich (84). Bei der

Analyse der die S4010 phosphorylierenden Kinasen wurde hier eine Abnahme der relativen Phosphorylierung des Troponin I als Indikator der PKA und PKG-Aktivität festgestellt. Kötter et al. (2013) beschrieben die S4010 als potentielle PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle (85). Allerdings zeigten sich im Vergleich der Gewebe von männlichen, weiblichen und trächtigen Rattenherzen keine signifikanten Unterschiede im Phosphorylierungsgrad des S4010-Rests, weshalb nicht von einer erhöhten PKA-vermittelten Phosphorylierung Titins auszugehen ist.

Insgesamt geben die erhobenen Daten keinen Hinweis auf eine durch PTMs am Titin signifikant erhöhte myokardiale Wandspannung in Herzen weiblicher und trächtiger Ratten verglichen mit männlichen Kontrollen. Beale et al. (2018) wiesen in klinischen Studien jedoch bei Frauen eine höhere systolische und diastolische LV-Steifigkeit als bei Männern nach (68). Eine erhöhte myokardiale Wandspannung mit erhöhten PKC $\alpha$  und/ oder CaMKII $\delta$  und herabregulierten PKG/PKA-Aktivitäten wurde bei verschiedenen Formen von Herzinsuffizienzen gefunden (30). Prinzipiell ist zu erwarten, dass eine hohe Titin-basierte Steifigkeit die diastolische Füllung des Ventrikels vermindert. Die Folge ist ein vermindertes Schlagvolumen (SV) mit reduziertem Herz-Zeit-Volumen (HZV) mit negativen Auswirkungen auf metabolische Stoffwechselforgänge (30). Da die Veränderungen der PEVK-Phosphorylierung und den daran beteiligten Kinasen in den untersuchten Geweben unterschiedlicher Geschlechter nicht signifikant waren ( $P > 0,05$ ), könnte möglicherweise der leichte Phosphorylierungsanstieg der S12022 in den Herzen weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten unterstützend auf die Herz-Kreislauffunktion wirken, da durch die funktionell erhöhten passiven Rückstellkräfte des Titins in der Relaxationsphase des Herzzyklus das Herz entlastet werden kann (31). Auch werden Veränderungen zu einer geringeren kardialen Steifigkeit unter der Norm mit Beeinträchtigungen des Frank-Starling Mechanismus entgegengewirkt (30). Eine pathologische Auswirkung auf die Herzfunktion scheint wegen nicht signifikanter Ergebnisse unwahrscheinlich. Eine Untersuchung des Vorgangs der ventrikulären Füllung sowie des SV würden die Auswirkungen der Veränderung der passiven Steifigkeit durch PTM des Titins klären.

### **4.3 Vergleich der Korrelationsergebnisse von Östrogen und Progesteron mit den Einzelwerten relativer Phosphorylierungen der Titin-I-Band Modifikationen und Protein-kinasen**

Trotz der statistisch nicht signifikant veränderten Mittelwerte fiel eine höhere Streuung der Einzelwerte in weiblichen gegenüber den männlichen Tieren auf. Mögliche Einflussfaktoren der erhöhten Streuungen könnten die im Rahmen der Dissertation ermittelten unterschiedlichen Sexualhormonkonzentrationen der Tiere sein. Folglich wurden die individuellen Östrogen (E2)- und

Progesteron Serumspiegel ( $n \geq 3$ ) der weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten mit den relativen Titinphosphorylierungen und den Kinase-Modifikationen korreliert.

Die Daten wiesen stärkere Korrelationsergebnisse beider Sexualhormone für die Titin-I-Band Phosphorylierungen bei trächtigen Ratten verglichen mit nicht trächtigen weiblichen Ratten nach. Interessanterweise zeigte Progesteron im Gegensatz zu Östrogen fast signifikante Korrelationen in trächtigen Ratten für S4010 ( $P = 0,06$ ) und S11878 ( $P = 0,06$ ) im Titin-I-Band. Ferner konnten ebenfalls in trächtigen im Vergleich zu nicht trächtigen weiblichen Ratten stärkere Korrelationen beider Sexualhormone für ERK1/2 detektiert werden. Im Gegensatz dazu korrelierten beide Sexualhormone mit Troponin I vor allem bei trächtigen Ratten antiproportional. Auffallend waren zuletzt stärkere Korrelationen der PKC $\alpha$  bei nicht trächtigen Ratten, die bei trächtigen Ratten abfielen.

Mögliche Erklärungsansätze für die stärkeren Korrelationsergebnisse des Progesteron im Vergleich zu Östrogen werden im Folgenden diskutiert.

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Serumhormonanaysen zeigten eine durchschnittliche Östrogenkonzentration von  $17,67 \pm 4,14$  pg/ml bei weiblichen nicht trächtigen und  $25,40 \pm 2,42$  pg/ml bei trächtigen Ratten. Östrogenwerte der männlichen Ratten lagen unter der Nachweisgrenze. Nillson et al. (2015) bestätigten die extrem niedrigen zirkulierenden Östradiolspiegel in adulten Ratten. Untersuchungen gonadal intakter männliche Mäuse zeigten Östradiolspiegel unterhalb der Nachweisgrenze ( $0,3$  pg/ml) (86). Trotz der deutlichen Unterschiede der Hormonkonzentrationen Östrogens im Serum weiblicher nicht trächtiger, trächtiger und männlicher Ratten konnten keine signifikanten Korrelationen bezüglich relativer Titinphosphorylierungen und den Kinase-Modifikationen gefunden werden. Die Korrelationsergebnisse zeigten bei minimal divergenten Plasmakonzentrationen weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten hohe Differenzen in den relativen Phosphorylierungen der PTM des Titin-I-Band und den beteiligten Kinasen. Beim Vergleich der Korrelationsergebnisse von Östrogen bei trächtigen mit nicht trächtigen weiblichen Ratten fielen stärkere Korrelationen der ERK1/2 ( $R$ -Quadrat =  $0,86$ ;  $P = 0,2484$ ) und Troponin I, als PKA und PKG Indikator (60, 61) ( $R$ -Quadrat =  $0,72$ ,  $P = 0,35$ ) bei trächtigen Ratten auf. Im Gegensatz dazu verminderte sich trotz höherer Östrogenwerte im Serum die Korrelation mit PKC $\alpha$  bei trächtigen Ratten ( $R$ -Quadrat =  $0,02$ ,  $P = 0,92$ ) im Vergleich zu nicht trächtigen weiblichen Ratten ( $R$ -Quadrat =  $0,47$ ,  $P = 0,20$ ). Unklar bleibt daher, ob allein Östradiol für das hohe Maß an Streuung der Einzelwerte aus den Ergebnissen des Kapitels 3.2.2. verantwortlich ist. Nillson et al. (2015) analysierten die Östradiolwerte im Serum weiblicher Mäuse und demonstrierten eine deutliche Schwankungsbreite mit dem Maximum von  $35$  pg/ml in deren Zyklusphasen. Auffallend war, dass Östradiol im Estrus ( $<0,3$  pg/ml) nicht nachgewiesen werden konnte (86). Die Zyklusphasen der Tiere wurden bei Bestimmung der Serumkonzentrationen der Sexualhormone im Rahmen der Dissertation nicht berücksichtigt. Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die hohe Streuung und folglich nicht signifikanten Korrelationsergebnisse sein.

Progesteron als weiteres Sexualhormon, das zwischen männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten variiert, wurde als alternative Einflussgröße in Betracht gezogen. Im Gegensatz zu Östradiol lieferten die Hormonanalysen von Progesteron im Serum weiblicher Mäuse nachweisbare Werte mit dem Maximum von 17000 pg/ml im Estrus und Minimum von 5000 pg/ml im Proestrus in allen Phasen des Sexualzyklus. Diese wiesen laut Literaturdaten gegenüber Östradiol geringer ausgeprägte Fluktuationen auf (86). Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Hormonanalysen zeigten Progesteronwerte mit durchschnittlich  $7,02 \pm 0,96$  ng/ml bei weiblichen nicht trächtigen und  $33,09 \pm 3,48$  ng/ml bei trächtigen Ratten. Durchgeführte Sexualhormonanalysen während der Altersentwicklung männlicher und weiblicher Ratten zeigten in der peripubertären und adoleszenten Phase bei weiblichen Ratten größere Differenzen der Progesteronwerte im Vergleich zu Östradiolwerten als bei männlichen Ratten (87). Auf Basis dieser Datenlage könnte neben dem Einfluss von Östrogen ein Teil der Streuung der Einzelwerte in den Gewebeproben der weiblichen Tiere auf das junge Alter der Ratten und den daraus resultierenden unterschiedlich hohen Progesteronwerten im Serum zurückzuführen sein. Ob sich eine stärkere Korrelation der Sexualhormone in älteren trächtigen und nicht trächtigen weiblichen Ratten zeigt, müsste in einem weiteren Versuch geprüft werden.

Die Korrelationen von Progesteron bezogen auf die Einzelwerte trächtiger Ratten ergaben proportionale Trends in S4010 (R-Quadrat = 0,76, P=0,06), S11878 (R-Quadrat = 0,74, P = 0,06) und S12022 (R-Quadrat = 0,57, P = 0,14). Es zeigte sich ein möglicher Einfluss Progesterons auf die PTMs im elastischen I-Band, der in weiblichen nicht trächtigen Ratten nicht detektiert wurde. In den weiblichen nicht trächtigen Tieren wurde ein deutlicher Trend zu einer antiproportionalen Korrelation ( $P > 0,5$ ) der Progesteronwerte mit den Serumprogesteronspiegeln nachgewiesen. Im Gegensatz dazu waren die beteiligten Kinasen von den Progesteron-Korrelationen in trächtigen und nicht trächtigen weiblichen Ratten relativ unbeeinflusst.

Vergleich man die Korrelationsergebnisse beider Sexualhormone miteinander, zeigten die Daten stärkere Korrelationsergebnisse von Progesteron auf die Titin-I-Band Phosphorylierung verglichen mit denen von Östrogen. Ein möglicher Einfluss von Progesteron auf die PTMs des Titins muss berücksichtigt werden. Die Östrogenwirkung kann trotz der stärkeren Korrelation Progesterons nicht ausgeschlossen werden. Auffallend war, dass weibliche nicht trächtige Ratten keine deutlichen Korrelationsergebnisse beider Sexualhormone verglichen mit trächtigen Ratten zeigten. Ursächlich für die stärkeren Korrelationen besonders der relativen Titinphosphorylierungen der trächtigen Ratten könnten die in der Schwangerschaft physiologisch gesteigerten Sexualhormonlevel sein (88). In kardialem Gewebe nachgewiesene ER und PR könnten durch ein erhöhtes Angebot von zirkulierendem Östrogen und Progesteron vermehrt angesprochen werden (18, 89). Sowohl die ERs und PRs signalisieren über langsame genomische und schnelle nicht-genomische Signalkaskaden (9, 18, 90). Im Gegensatz zu den zahlreichen in der Literatur beschriebenen aktivierten second messengern (SM) nach Östrogenapplikation werden für membranöse PRs (mPRs) nach

Progesteronbindung vor allem aktivierende Phosphorylierungen der MAPKs ERK1/2 und JNK1/2 beschrieben. Zusätzlich vermittelt die mPRs ihren nicht-genomischen Signalweg über das inhibitorische G-Protein  $G\alpha_i$ , welches die cAMP-Synthese vermindert (9, 12, 90). Daneben sind Aktivierungen von PKA, PKC sowie CaMKII nach Progesteron-Gabe beschrieben worden (91). Die Ergebnisse der an der Titinphosphorylierung beteiligten Kinasen zeigten zwischen den trächtigen und nicht trächtigen Ratten keine stärkeren Korrelationen trotz starker Korrelationen der relativen Titinphosphorylierungen. Es ließ sich lediglich eine leichte Korrelation der relativen ERK1/2 von Östrogen und Progesteron bei trächtigen verglichen mit nicht trächtigen Ratten feststellen. Der Signalweg über ERK1/2, der von beiden Sexualhormonen aktiviert wird, könnte durch die erhöhten Serumwerte in der Schwangerschaft vermehrt angesprochen werden, wodurch die starken Korrelationen mit den relativen Phosphorylierungen der S4010 innerhalb der N2B<sub>US</sub> erklären werden könnten. Die Korrelation für Troponin I, als Indikator für PKA und PKG Aktivitäten (9, 12, 30, 90), mit Östrogen und Progesteron nahm bei trächtigen Ratten verglichen mit nicht trächtigen Ratten eine starke Antiproportionalität ein. Die Antiproportionalität schien keinen Einfluss auf die starke Korrelation beider Sexualhormone mit der S4010 bei trächtigen Ratten zu nehmen. Dies könnte als ein Hinweis für ein vermehrtes Ansprechen des ERK1/2 Signalwegs durch beide Hormone gewertet werden. Die besseren Korrelationsergebnisse der S4010 bei Progesteron als bei Östrogen können durch den kontinuierlichen Anstieg des Progesteron während der Trächtigkeit der Ratten, der erst am 19. Tag der Trächtigkeit stark abfällt, erklärt werden (92). Die Serumwerte Östrogens sind konstant und verdoppeln sich vom 18. bis zum 21. Tag der Trächtigkeit (93).

Östrogen und Progesteron korrelierten stark mit den PEVK-Phosphorylierungsstellen bei trächtigen Ratten trotz fehlender Korrelationen der untersuchten PKC $\alpha$  Kinase. Die geringe n-Zahl und hohe Streuung der Werte bei Östrogen limitierten die Aussagekraft des Ergebnisses der PKC $\alpha$  Korrelation, zumal bei nicht trächtigen weiblichen Ratten eine PKC $\alpha$  Korrelation mit Östrogen bei höherer n-Zahl gefunden wurde. Trotz beschriebener PKC-Signalwege von Progesteron (91) wurde keine aussagekräftige Korrelation für Progesteron mit PKC $\alpha$  gefunden. Trotzdem zeigten die Daten starke Korrelationen in den Phosphorylierungsstellen von S12022 und S11878 mit Progesteron. Folglich stellt sich die Frage, ob an Stelle von PKC $\alpha$  ein anderes Signalprotein, wie beispielsweise CaMKII, vorrangig aktiviert wird. Korrelationen mit CaMKII bei trächtigen Ratten müssten analysiert werden und könnten Aufschluss über einen stärkeren Zusammenhang mit den Korrelationsergebnissen der PEVK-Region geben (30). Die stärkeren Korrelationen der PEVK-Region für Progesteron verglichen mit Östrogen bei trächtigen Ratten könnten durch die Unterschiede in den Sexualhormonleveln während der Trächtigkeit bei Ratten begründet sein (92, 93).

## 4.4 Limitationen der Korrelationsergebnisse

Die Beurteilbarkeit der Korrelationen der Sexualhormone Östrogen und Progesteron mit den untersuchten Proteinen wird durch mehrere Einflussfaktoren limitiert, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Gestagene und Östrogene variieren zwischen den jeweiligen Zyklusphasen (86). Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Hormonanalysen differenzierten die Werte nicht in die einzelnen Phasen. Es wäre daher möglich, dass die ermittelten Östradiolwerte Zyklusphasen mit niedrigen Grundkonzentrationen des Östrogens (Diestrus, Estrus, und Metestrus) zugeordnet werden können, was zu falsch negativen Korrelationsergebnissen führen könnte. Aufgrund des schnellen Durchlaufs der Zyklusphasen bei Ratten scheint dies nicht unwahrscheinlich zu sein (81). Der Proestrus mit maximalen Östrogenspiegeln (35 pg/ml) weist im Vergleich zu den Differenzen der Fluktuationen der Progesteronwerte in den einzelnen Zyklusphasen einen stärkeren Anstieg auf (86). Dieser stärkere Anstieg könnte zu vermehrtem Ansprechen der zu untersuchenden second messenger PKC ERK1/2 und PKA sowie PKG der nicht genomischen Signalwege der Sexualhormone mit Phosphorylierungen des Titins führen. Der Vergleich des Verlaufs der Gestagene in den Zyklusphasen könnte darauf hinweisen, dass bei maximaler Einflussnahme von Östrogen im Proestrus Progesteron im Estrus, Metestrus und Diestrus dominierend ist (86). Um valide Korrelationsergebnisse zu generieren, müssten die Werte der Gestagene in die Zyklusphasen eingeteilt und die n-Zahl, bei schnellem Durchlaufen der Zyklusphasen, angehoben werden (81). Zudem erscheint eine genaue Differenzierung schwierig, weil nicht nur die Sexualhormonlevel, sondern auch die Anzahl der Östrogen- und Progesteronrezeptoren besonders während der Schwangerschaft variieren (94).

Die durchgeführten Korrelationen mit einer n-Zahl von maximal 5 scheinen nur begrenzt aussagekräftig zu sein. Das bedeutet, dass die geringe Anzahl mitunter nur einen Hinweis darauf gibt, dass eine signifikante Korrelation vorliegen könnte. Zur Verifizierung wäre ein Datensatz mit einer deutlichen höheren Anzahl von Tieren sinnvoll, um die Streubreite der Einzelwerte zu minimieren und niedrigere P-Werte zu erhalten. Daneben könnte zusätzlich wie oben bereits erwähnt das Alter der Tiere berücksichtigt werden, um Fluktuationen der Sexualhormone zu reduzieren (87).

Ferner wird das Vorhandensein von gewebsspezifischen Aromatasen im Herzen beschrieben, die die Umwandlung von Testosteron in 17 $\beta$ -Östradiol katalysieren mit protektiven Auswirkungen auf die zelluläre Integrität und auf das Ausmaß der Herzscheidung bei dem Modell eines akuten Myokardinfarkts (95). Die durch die lokale Östrogensynthese vorhandene intrazelluläre Östrogenkonzentration mit ihren potenziellen Auswirkungen auf die Titin-basierte myokardiale Steifigkeit wird in den Korrelationsergebnissen, welche ausschließlich die extrazellulären Serumlevel des Östradiols beinhalten, nicht berücksichtigt. Neben den zirkulierenden extrazellulären

Östrogenen muss folglich auch die kardiale lokale Östrogensynthese für das Beurteilen der Korrelationsergebnisse in Betracht gezogen werden.

## 4.5 Rolle des GPER30 im Herzen

Die Östrogene entfalten ihre Wirkung, indem sie an ihre spezifischen Rezeptoren binden. Aktuell sind nur 3 Rezeptoren bekannt, die alle Wirkungen der Östrogene vermitteln. Die im Zytoplasma lokalisierten ER $\alpha$  und ER $\beta$  sind meist mit den direkten und indirekten genomischen Signalwegen assoziiert, welche zur Zielgenexpression führen. Dem gegenüber steht der mit ER $\alpha$  und ER $\beta$  nicht genetisch und strukturell verwandte Orphan-G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30 (GPER30). Er befindet sich in der Plasmamembran und steuert den schnellen nicht-genomischen Signalweg über Protein-Kinasen-Kaskaden, die schließlich zu indirekten Veränderungen der Genexpression durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führen können (96). Neben dem GPER30 werden auch bestimmte ER $\alpha$  und ER $\beta$  Varianten in der Plasmamembran nachgewiesen, die Einfluss auf den nicht-genomischen Signalweg haben können (96, 97). Die detaillierten Signalwege des Östrogens werden in Kapitel 1.2.5 beschrieben. Kardialer GPER30 übt unter kardialen Stress einen direkten Schutz im Herzen aus, indem die Apoptose von Kardiomyozyten gehemmt wird (22). Ebenfalls wird über beeinträchtigte linksventrikuläre Herzfunktion bei männlichen GPER30-defizienten Mäusen berichtet (22). Die GPER30-vermittelte Kardioprotektion konnte im Ratteninfarktmodell bestätigt werden. Perfundierte Herzen wurden mit dem GPER30 spezifischen Liganden G1 in Anwesenheit oder Abwesenheit von GPER30 Antikörpern behandelt. Die Gabe von G1 vor einer globalen Ischämie-Reperfusion führte zu einer dramatischen Reduktion des Myokardinfarktareals. Die durch GPER30 induzierte Kardioprotektion führte zu einer Steigerung der funktionellen Erholung der Kontraktilität (21). Der genaue Mechanismus auf die diastolische Funktion ist jedoch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise könnte der GPER30 seinen kardioprotektiven Effekt auch durch Veränderungen der PTMs des kardialen Titins vermitteln. Kötter et al. (2016) zeigten nach Myokardinfarkt Veränderungen der PTMs des Titins mit resultierender Steifigkeitszunahme im remote Areal bei funktionslosem Infarktareal als Anpassungsmechanismus an die erhöhten mechanischen Anforderungen (98). Ob ein Zusammenhang mit den GPER30 Rezeptoren besteht, wurde nicht untersucht, wäre aber denkbar. Somit könnten die schnellen nicht genomischen Signalwege des GPER30 direkt an der PTM des Titins beteiligt sein und mögliche Steifigkeitsunterschiede zwischen männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten erklären. Aufgrund des noch relativ unerforschten GPER30 wurden im Rahmen der Dissertation seine zelluläre Lokalisation sowie seine Auswirkungen mittels schneller nicht genomischer Signalwege auf PTMs des Titins untersucht.

## 4.6 Translokation des GPER30 in das transversale Tubulussystem nach Hormongabe

Da für die Schnelligkeit der Signalwege unter anderem die Entfernung des Rezeptors zum Zielprotein entscheidend ist, wurde die Lokalisation des kardialen GPER30 vor und nach Hormongabe bestimmt (99). Interessanterweise konnten Deschamps und Murphy (2009) gleiche GPER30-Konzentrationen in männlichen und weiblichen isolierten RCMs nachweisen (21). Die durchgeführten Serumhormonanalysen von Östrogen lagen bei männlichen im Gegensatz zu weiblichen Ratten unterhalb der Nachweisgrenze. Um ein möglichst starkes Ansprechen der Rezeptoren nach Östrogengabe zu erzielen, wurden für die Lokalisationsanalysen des GPER30 männliche isolierte RCMs verwendet. Ziel des Einsatzes von Fulvestrant war, die agonistischen Effekte von Östrogen am GPER30 zu minimieren, um so das Ansprechen des GPER30 durch Östrogen zu bestätigen. Fulvestrant wird in den meisten Studien als Vollantagonist von ERs, der ERs herabreguliert und keine agonistischen Effekte hat, beschrieben (16). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Fulvestrant auch den GPER30 aktivieren kann und somit als Partialagonist des Östrogens klassifiziert werden kann (97). Dies war jedoch zu Beginn der im Rahmen der Dissertation durchgeführten Versuchen nicht bekannt. Überraschend waren daher die Ergebnisse am GPER30 nach Gabe von Fulvestrant. Diese stimmten mit den Wirkungsweisen des Fulvestrants, die in oben genannten Studien beschrieben wurden, überein und werden im Folgenden näher beleuchtet. Nach der Gabe sowohl von Östrogen, Fulvestrant als auch der kombinierten Gabe verschwand das in unstimulierten RCMs diffuse punktförmige Verteilungsmuster und kolokalisierte mit der alpha-Aktinin Färbung in der Z-Scheibe. Dies deutete auf eine substanzbedingte Translokation des GPER30 in die Z-Scheiben Region hin. Möglicherweise handelte es sich bei der punktförmigen Verteilung in nicht-stimulierten Zellen um Caveolae, die definitionsgemäß Plasmamembraneinstülpungen sind (100). In diesen wurden Östrogenrezeptoren wie ER $\alpha$  in membrangebundener Form zum Beispiel in glatter Uterusmuskulatur nachgewiesen (94, 101). Es wäre daher denkbar, dass GPER30 unter basalen Bedingungen ebenfalls in den Caveolae lokalisiert sind. Turi et al. (2001) zeigten, dass Östrogen zu einer Senkung des Caveolinspiegels in glatten Muskelzellen des Uterus führt und die Bildung der Caveolae in der Plasmembran inhibiert (94). Das Östrogen-induzierte Verschwinden der punktförmigen Verteilung zugunsten einer stärkeren Kolokalisation des GPER-Signals mit der Z-Scheibe wurde auch in den hier durchgeführten Zellfärbungen beobachtet. Allerdings berichteten Turi et al. (2001), dass der Östrogenantagonist Fulvestrant die Expressionsrate von Calveolin und die Bildung von Cavoelae steigert (94). Dies deckte sich nicht mit den im Rahmen der Dissertation erhobenen Ergebnissen der Zellfärbungen. Um ein mögliches Vorhandensein des GPER30 in den Caveolae zu verifizieren, müsste eine Kolokalisation von fluoreszenzmarkierten GPER30- mit Calveolin-Antikörpern nachgewiesen werden. Quantifiziert wurden die Signalintensitätserhöhungen der Z-Scheiben Regionen durch densitometrische Analysen, die signifikante Anstiege um 35,5% (P=0,003) in Östrogen-, 31,4% (P=

0,005) in Fulvestrant-stimulierten Zellen und 31,3% (P= 0,005) bei kombinierter Gabe im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen zeigten. Auffallend und unerwartet waren Signalintensitätserhöhungen der Z-Scheibe und die Abnahme der punktförmigen Verteilung nach Gabe von Fulvestrant. Dieses wird als Voll-Antagonist der Östrogenrezeptoren beschrieben (16). Jüngere Studien wiesen Fulvestrant nunmehr als Vollantagonist der nukleären ER $\alpha$  und ER $\beta$  nach. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur scheint GPER30 im Gegensatz zu den nukleären ERs durch Fulvestrant aktiviert zu werden (97). Auch in anderen Studien wurde die fehlende antagonistische Wirkung von Fulvestrant bei Östrogenstimulation bemerkt (102, 103). Möglicherweise könnten durch die Inhibition der nukleären ER $\alpha$  und ER $\beta$  die membrangebundenen GPER30 vermehrt gebunden und aktiviert werden, was die Signalintensitätserhöhungen durch Fulvestrant am GPER30 erklären könnte. Dieses Ergebnis unterstreicht die partialagonistischen Effekte des Fulvestrants an den Östrogenrezeptoren und geht mit den neueren Studienergebnissen bezüglich der Wirkungsweise von Fulvestrant einher (97, 102, 103). Die Z-Scheiben Region wird mit den myofibrillären Strukturen des transversalen Tubulussystems (T-Tubuli) assoziiert, die definitionsgemäß Einstülpungen der Zellmembran in das Zellinnere sind (104). Eventuell verursacht die Translokalisierung der GPER30 in die T-Tubuli eine Verringerung der Entfernung von Rezeptor zu Zielprotein, sodass der nicht-genomische Signalweg durch örtliche Veränderung des GPER30 in seiner Schnelligkeit unterstützt wird. Das T-Tubuli System steht mit dem longitudinal angeordneten Netzwerk (L-Tubuli) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) über synapsenartige Kontaktstellen in Verbindung. Das SR fungiert als Calciumspeicher und kann die kardiale intrazelluläre Calciumkonzentration durch Calcium-induzierte Calciumfreisetzung erhöhen (104). Schnelle nicht-genomische Signalwege der Östrogenrezeptoren induzieren Veränderungen im intrazellulären Calciumlevel (96). Bestätigt wurde dies durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Östradiol in humanen arteriellen Endothelzellen (97). Die Östrogenrezeptoraktivierung könnte somit zur Unterstützung des Kontraktionszyklus des Herzens mittels Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration beitragen. Entwicklungen von Herzinsuffizienzen, die mit dysreguliertem Calcium-Signalwegen verbunden sind, könnten damit entgegengewirkt werden (105). Eine schnelle Calciummobilisierung von membranständigen GPER30, welche die Östrogen-induzierten Effekte in Tumorzellen analysierten, bestätigten Revankar et al. (2007) nicht. Sie wiesen neben membranständigen GPER30 auch intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum exprimiertes GPER30 nach, das für den schnellen Anstieg nach Östrogenapplikation verantwortlich sein soll (106).

Zusammenfassend ergeben sich folgende Befunde: Die vorgestellten Zellfärbungen zeigten eine Signalintensitätssteigerung der Z-Scheiben Regionen nach Hormongabe von Östrogen und dem Östrogenantagonisten Fulvestrant im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen. Dies deutet auf das Ansprechen des GPER30 durch beide Stimulanzen hin. Wegen des partialagonistischen Effekts des Fulvestrants am GPER30 konnte kein Signalintensitätsabfall bei Fulvestrant-stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Das Verschwinden der punktförmigen Verteilung nach Stimulation als Indiz für das Vorhandensein von in Caveolae lokalisierten GPER30 erklärt möglicherweise die

Translokation der GPER30 in die Z-Scheiben Regionen. Die Translokation der Rezeptoren ergab ein geordnetes Lokalisationsmuster der GPER30 in der Zellmembran. Die daraus resultierende Minimierung der Entfernung des Rezeptors zum Zielprotein könnte die Schnelligkeit nicht genomischer Signalwege unterstützen.

## **4.7 Bestätigung des Ansprechens der zu untersuchenden Signalwege durch das Antidiabetikum Metformin**

Um ein möglichst starkes Ansprechen der Rezeptoren nach der Gabe von Östrogen zu erzielen, wurden für die zu untersuchenden Signalwege männliche isolierte RCMs verwendet. Vor Stimulation der RCMs durch Östrogen und Fulvestrant wurde das Ansprechen der an den PTMs des Titins beteiligten Kinasen PKC $\alpha$ , ERK1/2 und Troponin I durch Gabe des Antidiabetikums Metformin überprüft. Metformin fungierte folglich als Positivkontrolle. Hopf et al. (2018) zeigten in mit Metformin behandelten adulten diabetischen RCMs einen signifikanten Anstieg der relativen PKC $\alpha$ - und ERK1/2- Phosphorylierungen (65). Die Positivkontrolle Metformin steigerte in der vorliegenden Dissertation ebenfalls die relative PKC $\alpha$ - (P = 0,003) sowie ERK1/2- Phosphorylierungen (P = 0,024) signifikant, was für das Ansprechen der Signalwege spricht. Eine Änderung der relativen Phosphorylierung des Troponin I an Ser23/24 blieb aus. Metformin als ein insulinsensibilisierendes Antidiabetikum verbessert bei herzinsuffizienten Patienten den myokardialen Energiestoffwechselstatus unter anderem durch die Aktivierung der AMP (Adenosinmonophosphat)-aktivierten Proteinkinase (AMPK) (107). Kardiales Troponin I (cTnI) ist ein geeignetes In-vitro-AMPK-Substrat, das durch AMPK hauptsächlich auf Ser150 phosphoryliert wird. Die Untersuchungen des Effekts einer AMPK Aktivierung auf cTnI durch den AMPK Agonisten AICAR zeigten jedoch keine Änderungen des Phosphorylierungsstatus von Ser23/24 (66) in Übereinstimmung mit den Daten der hier vorliegenden Dissertation. Die Konstanz der Phosphorylierung der Ser 23/24 des Troponin I wurde als indirektes Zeichen zur Bestätigung des Signalwegs durch Metformin angenommen. Einen vollständigen Nachweis könnten entsprechende Untersuchungen der Phosphorylierungsstelle von Ser150 bei Metformin stimulierten RCMs geben.

## **4.8 Fehlender signifikanter Effekt niedriger physiologischer Östrogenkonzentrationen auf die Titin-I-Band-Phosphorylierung und Kinaseaktivitäten**

Zur Untersuchung der schnellen nicht-genomischen Signalwege der transmembranösen Östrogenrezeptoren auf mögliche Veränderungen der PTMs des Titins und Kinasemodifikationen wurden adulte männliche RCMs isoliert. Da im Serum männlicher Ratten keine nachweisbaren Östradiolmengen feststellbar waren, wurden die Zellen im ersten Versuchsansatz zunächst mit physiologischen Östradiolkonzentrationen von 10 nM stimuliert. Die eingesetzten Konzentrationen von Östradiol und Fulvestrant entsprachen den Literaturwerten vorangegangener Studien (108, 109).

Statistisch signifikante Veränderungen der PTM innerhalb der PEVK- und N2B<sub>us</sub> Regionen blieben bei Stimulation mit den oben genannten Konzentrationen aus. Veränderungen der relativen Phosphorylierungen wurden ausschließlich in der Phosphorylierungsstelle S12022 und den Kinasen PKC $\alpha$  und ERK1/2 beobachtet. Werden die Ergebnisse mit denen aus den Gewebeproben männlicher, weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten aus Kapitel 3.2.2 verglichen, fällt ein ähnliches Muster der Veränderungen der relativen Phosphorylierungen mit Tendenzen zu erhöhten Phosphorylierungen der PKC $\alpha$  mit singulärer relativer Phosphorylierungszunahme der S12022 und gleichbleibender S11878 auf. Die Veränderungen der relativen Phosphorylierungen, die in männlichen RCMs nach Hormongabe auftraten, könnten auf den Effekt von Östrogen über GPER30 in physiologischen Konzentrationen hindeuten. Interessanterweise wurden keine deutlichen antagonistischen Effekte bei singulärer und kombinierter Gabe mit Fulvestrant beobachtet. Vielmehr scheint es so, als würden die schnellen nicht genomischen Signalwege des GPER30 nach Fulvestrantgabe in männlichen RCMs aktiviert werden, was für den agonistischen Effekt Fulvestrants am GPER30 spricht. Im Folgenden werden mögliche Erklärungsansätze für die erhobenen Ergebnisse der untersuchten relativen Titinphosphorylierungen und Kinasen diskutiert.

Östradiol scheint über den GPER30-vermittelten PKC $\alpha$ -Signalweg (110) die relative Phosphorylierung der S12022 in männlichen RCMs zu verändern. Die nach Östrogengabe stattgefundenen Änderung der S12022-Phosphorylierung weist Ähnlichkeiten mit den erhöhten relativen Phosphorylierungen der PEVK-Region aus LV-Gewebe weiblicher nicht trächtiger und trächtiger Ratten (vgl. 4.2) auf. Aufgrund der fehlenden Signifikanz der relativen Phosphorylierungen im elastischen Titin I-Band nach Gabe von niedrig physiologischen Östrogenkonzentrationen scheint eine Veränderung der Titin-basierten myokardialen Steifigkeit unwahrscheinlich. Ob der gesteigerte singuläre Anstieg um  $37,4\% \pm 9,7\%$  der S12022-Phosphorylierung durch die um  $22,8 \pm 15,8\%$  gesteigerte relative Phosphorylierung der PKC $\alpha$  erklärt werden kann, ist unklar. Alternativ könnte eine gesteigerte CaMKII $\delta$ -Aktivität dafür verantwortlich sein. Die katalytische Aktivität der herzspezifischen CaMKII $\delta$  wird durch Calcium ligandiertes-Calmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM) reguliert (111). Analysen innerhalb des kardiovaskulären Systems zeigten eine durch 17 $\beta$ -Östradiol Hochregulation des gesamt-CaM und freien-Ca<sup>2+</sup>/CaM Spiegels in Endothelzellen. Diese Effekte wurden über die Transaktivierung von EGFR mit anschließender MAPK-Aktivierung durch GPER30 vermittelt. Östradiol erzeugte über GPER30 eine Feedforward-Schleife, die die Ca<sup>2+</sup>/CaM-Signale im endothelialen CaM-Zielnetzwerk verstärkte (112). Demzufolge könnten Effekte der CaMKII $\delta$  auf die Titin-basierte myokardiale Steifheit ein möglicher alternativer Erklärungsansatz für die Tendenz des Anstiegs der S12022-Phosphorylierung sein. Allerdings müsste eine erhöhte CaMKII $\delta$ -Aktivität mit einer erhöhten Genexpression CaMKII $\delta$  verbunden sein (113). Eine gesteigerte Genexpression von CaMKII $\delta$  durch schnelle nicht genomische GPER30 Signalwege ist eher unwahrscheinlich, müsste aber geprüft werden. Ferner zeigten Ma et al. (2009) in OVX Ratten, an denen eine Ischämie / ein Reperfusionsversuch im Herzen durchgeführt wurde, neben herabregulierten PKA-Aktivitäten zudem verminderte CaMKII $\delta$ -

Aktivitäten nach Östrogengabe (114). Diese Ergebnisse widersprechen einem möglichen Effekt der CaMKII $\delta$  auf die PEVK- und N2Bus-Regionen im elastischen I-Band. Wahrscheinlicher für die akuten Veränderungen der PTMs des Titins könnte folglich die untersuchte Kinase PKC $\alpha$  sein, die als second messenger im schnellen nicht genomischen Signalweg der ERs beteiligt ist und dessen Aktivität nicht von der Genexpressionsrate abhängt (9). Der mögliche Effekt der CaMKII $\delta$ -Aktivität aus Kapitel 4.2 scheint dennoch möglich zu sein, da dort chronische Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase zwischen männlichen, weiblichen nicht trächtigen und trächtigen Ratten auftreten könnten, die zu einer Aktivierung der Genexpression führen (113).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Gewebeanalyse zeigten die der Hormonstimulationstest um  $47,2 \pm 15,2$  % erhöhte relative Phosphorylierungen der ERK1/2 in E2-stimulierten Zellen, was durch den schnellen nicht-genomischen Signalweg über GPER30 signalisiert werden könnte. Deschamps et al. (2009) berichteten ebenfalls von einer erhöhten Phosphorylierung der ERK1/2 nach Stimulation des GPER30 mit einem spezifischen GPER30 Agonisten (G1) (21). Gleiche Effekte waren auch in Fulvestrant-stimulierten Zellen zu finden, die für den agonistischen Mechanismus am GPER30 sprechen (97). Interessanterweise trat der erhöhte Phosphorylierungseffekt der ERK1/2 bei kombinierter Gabe nicht auf. Eine kompetitive Hemmung des Östradiols und Fulvestrants am GPER30 mit Verhinderung der Signalweiterleitung erscheint aufgrund der agonistischen Wirkweise beider Stimulanzien unwahrscheinlich. Zudem könnte Östrogen auch an membranöse ER $\alpha$  und ER $\beta$ , die ebenfalls mit dem schnellen nicht-genomischen Signalweg assoziiert sind, binden, was die Bindung von Fulvestrant an den GPER30 erleichtern würde (21). Die erhöhte Varianz ergab eine Standardabweichung von 48,4% bei kombinierter Gabe von Östrogen mit Fulvestrant, was das sichere Beurteilen erschwert. Die erhöhten ERK1/2 Phosphorylierungen zeigten keine statistisch signifikanten Effekte auf die S4010-Phosphorylierung innerhalb der N2Bus, wie Koser et al. (2019) beschreiben (30). Mögliche Trends innerhalb der S4010 wurden ebenfalls aufgrund der hohen Varianz bei stimulierten RCMs nicht festgestellt. Raskin et al. beschreiben neben der S4010 unter anderen Ser-3873, Ser-3915, Ser-3965 als andere Phosphorylierungsstellen innerhalb der N2Bus, die Zielstrukturen von ERK1/2 sein können (115). Möglicherweise könnten hier Effekte einer gesteigerten ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Östrogen- und Fulvestrant gefunden werden. Zusammenfassend konnte im ersten Stimulationsversuch gezeigt werden, dass Östrogen in niedrig physiologischer Konzentration einen leichten Effekt auf die relativen Titinphosphorylierungen der S12022 im Bereich der PEVK-Region und der daran beteiligten Kinase PKC $\alpha$  ausübt ohne statistisch signifikante Auswirkung auf die kardiale Titinsteifheit zu zeigen. Interessanterweise wiesen hormonell behandelte männliche RCMs bis auf die gesteigerten ERK1/2 Aktivitäten ähnliche relative Phosphorylierungen der untersuchten Proteine auf wie das LV-Gewebe weiblicher und weiblicher trächtiger Ratten. Die Ergebnisse dieses Hormonstimulationsversuches könnten einen Hinweis auf den Effekt von Östrogen auf die relativen Phosphorylierungen im Gewebe liefern.

## 4.9 Agonistische Effekte von Fulvestrant bei fehlendem Effekt hoher physiologischer Östrogenkonzentrationen auf die Titin-I-Band-Phosphorylierung und Kinaseaktivitäten

Bei fehlenden signifikanten Effekten niedrig physiologischer Östrogenkonzentrationen wurden im zweiten Stimulationsversuch die Auswirkungen höherer Konzentrationen von Östrogen und Fulvestrant auf die PTMs des Titins untersucht. Östrogen und Fulvestrant wurden in einer 10-fach höheren Konzentration von 100 nM eingesetzt. Die erhöhte Stimulationsmenge befindet sich im oberen physiologischen Normbereich (116). Die Stimulationsdauer blieb mit 1h zunächst unverändert. Erneut wurden keine statistisch signifikanten Effekte durch Östrogen weder in den relativen Titinphosphorylierungen noch in den untersuchten Kinasen detektiert. Relative Phosphorylierungen der PKC $\alpha$  in stimulierten Zellen zeigten nach Fulvestrant- und der kombinierten Gabe von Fulvestrant und Östrogen statistisch signifikante Erhöhungen um  $83,1 \pm 23,4\%$  ( $P = 0,003$ ) beziehungsweise  $87,9 \pm 18,7\%$  ( $P = 0,002$ ) und sind im Vergleich zu den Ergebnissen des ersten Stimulationsansatzes um  $59,6\%$  beziehungsweise  $53,8\%$  gestiegen. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der erhöhten Konzentrationsmenge der Stimulantien. Mit einer Erhöhung der relativen Phosphorylierung um  $31,2 \pm 7,6\%$  in Östrogen-stimulierten Zellen stieg diese verglichen mit der relativen Phosphorylierung des ersten Stimulationsversuchs lediglich um  $8,4\%$ . Die erhöhte Stimulationsmenge von Östrogen scheint keinen ausgeprägten Effekt auf die PKC $\alpha$ -Aktivität zu haben. Unklar bleibt die signifikante Erhöhung der relativen Phosphorylierung bei kombinierter Gabe. Erneut wird der agonistische Effekt von Fulvestrant (97) bestätigt, da sich im Vergleich mit singulärer Östrogengabe die relative Phosphorylierung um  $56,7\%$  erhöht. Möglicherweise könnten die Affinitätsunterschiede von Fulvestrant und Östradiol zum GPER30 die unterschiedlichen relativen Phosphorylierungen erklären. Neben der agonistischen Wirkung von Fulvestrant am GPER30 wurden 10 mal höhere Bindungsaffinitäten am GPER30 für Fulvestrant im Vergleich zu  $17\beta$ -Östradiol beschrieben (117). Obwohl der GPER30 für Östrogen eine höhere (1000x) Selektivität im Vergleich zu den anderen Derivaten der Steroidfamilie wie Testosteron oder Progesteron aufweist (117), könnten die Affinitätsanalysen die Ergebnisse der erhöhten relativen Phosphorylierungen bei Fulvestrant verglichen mit Östradiol des Stimulationsversuchs erklären. Die Effekte der erhöhten PKC $\alpha$ -Aktivitäten in stimulierten Zellen gingen mit erhöhten relativen Phosphorylierungen der S12022 einher und bestätigen die Tendenzen der Ergebnisse des ersten Stimulationsversuchs. Wieder zeigte sich der Einfluss der Konzentrationserhöhung nur in Fulvestrant-stimulierten Zellen und bei kombinierter Gabe mit Östrogen. Mit einer Erhöhung um  $64,2 \pm 37,3\%$  bei Fulvestrant- und  $83,0 \pm 39,3\%$  bei Fulvestrant mit Östradiol-stimulierten Zellen stiegen die relativen Phosphorylierungen verglichen mit denen aus dem ersten Stimulationsansatz um  $18,6\%$  beziehungsweise  $43,5\%$  an. Dagegen bewirkte die 10-fach höhere Stimulationsmenge von Östradiol keine nennenswerten

Änderungen der S12022-Phosphorylierung im Vergleich zum ersten Stimulationsversuch. Die ähnlichen Tendenzen der Ergebnisse aus der relativen Phosphorylierung der PKC $\alpha$  und S12022 legen die Vermutung nahe, dass GPER-aktivierte Signalwege an diesen PTMs beteiligt sind. Unklar bleibt dagegen, weshalb die gesteigerte PKC $\alpha$  Aktivierung nicht wie erwartet zu einer erhöhten relativen Phosphorylierung der S11878 führt. Die Phosphorylierung von S11878 durch die herzspezifische PKC $\alpha$  wird durch Hidalgo et al. 2009 beschrieben und ist seither in mehreren Studien verschiedener Arbeitsgruppen bestätigt worden (56). Vor allem die unveränderte Phosphorylierung der S11878 in Fulvestrant-stimulierten Zellen ist angesichts der um  $83,1 \pm 23,4\%$  erhöhten PKC $\alpha$ -Phosphorylierung überraschend.

Deschamps et al. (2009) berichteten über die ERK1/2-Aktivitätszunahme nach Aktivierung des GPER30 (21). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der ERK 1/2 Phosphorylierung nach kombinierter Gabe von Östradiol und Fulvestrant beobachtet werden. Singuläre Fulvestrant-Gabe zeigte einen deutlichen Trend zu einer erhöhten ERK-Phosphorylierung, im Vergleich zu Kontrollzellen ( $P = 0,082$ ). Interessant ist das zum ersten Stimulationsversuch um  $34,1\%$  reduzierte Ansprechen der ERK1/2 nach Östradiol-Applikation. Möglicherweise führen erhöhte Stimulationsmengen von Östradiol zu antagonistischen Effekten am GPER30. Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von Östradiol auf die durch den GPER30 vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung wird kontrovers diskutiert. Interessanterweise wurde eine verminderte Expression von GPER30 in Zellen des Myometriums schwangerer Frauen nach 24h Behandlung mit  $100 \text{ nM } 17\text{-}\beta\text{-Östradiol}$  nachgewiesen (118). Möglicherweise könnte dieser Effekt auch in myokardialen Zellen auftreten. Ebenfalls konnten Juan et al. (2004) in Zellkulturexperimenten von Endothelzellen des kardiovaskulären Systems, die eine dehnungsinduzierte Endothelin 1- (ET-1)-Expressionbehandlung erhielten, eine signifikante Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung nach Präinkubation mit  $100 \text{ nM } \text{Östradiol}$  aufweisen (119). Konzentrationen von  $100 \text{ nM}$  zeigten inhibitorische Effekte in extrakardialen Geweben. Inwieweit dies auf Rattenkardiomyozyten übertragen werden kann, muss geklärt werden.

Die erhöhte Stimulationsmenge führte auch zu einem Anstieg der relativen Troponin-I Phosphorylierung auf die  $132 \pm 33,3\%$  in Fulvestrant- beziehungsweise  $109,4 \pm 42,44\%$  in Fulvestrant mit Östradiol-stimulierten Zellen. Zudem ist eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme der relativen Phosphorylierung des Troponins I nach singulärer Östradiolstimulation zu beobachten. Die festgestellten Änderungen der Troponin I-Phosphorylierung nach Gabe von Östradiol und/ oder Fulvestrant legen eine geänderte Aktivität der Proteinkinase A nahe. Beale et al. (2018) beschrieben eine verminderte Expression der PKA durch Östrogengabe, die mit der Hypophosphorylierung des Troponin I, einherging (68). Dies wurde ebenfalls von Ma et al. (2009) nachgewiesen (114). Andere Studien bestätigten eine PKA-Aktivitätszunahme durch Aktivierung des GPER30 (117), was die in dieser Arbeit gezeigten erhöhten Phosphorylierungsniveaus nach Fulvestrantgabe erklären könnten.

Trotz signifikanter Veränderungen der relativen Phosphorylierungen von ERK1/2 und Troponin I blieben Veränderungen der Titin Phosphorylierungsstelle S4010 aus. Die S4010 wird als Phosphorylierungsziel der ERK1/2- und PKA-Aktivitäten beschrieben (58, 120). Somit erscheinen gleichbleibende Phosphorylierungsgrade bei signifikanten Veränderungen der Kinasen überraschend. PTMs des Titins sind feinregulierte Mechanismen, die durch das Zusammenspiel von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen reguliert werden (30). Ein Erklärungsansatz für die ausbleibenden Veränderungen der S4010 könnten aktivierte Phosphatasen sein, die den Hyperphosphorylierungen der S4010 entgegenwirken. Obwohl vergleichsweise wenig über Proteinphosphatasen bekannt ist, identifizierten kürzlich veröffentlichte Studien die Serin/ Threonin-Protein-Phosphatase (PP) 5, die an verschiedene Phosphorylierungsstellen innerhalb der N2Bus bindet und diese desphosphoryliert. Eine östradiolabhängige Aktivierung der PP5 könnte daher die Ergebnisse der nicht erhöhten S4010 Phosphorylierung erklären. Neben der PP5 werden auch PP1 und PP2 beschrieben, die zusätzlich die PEVK-Region dephosphorylieren (30). Eine generell erhöhte Phosphataseaktivität könnte daher auch den nicht so ausgeprägten Anstieg der relativen Phosphorylierung der S12022 und S11878 verglichen mit den signifikanten Anstiegen der PKC $\alpha$  erklären.

Die fehlenden statistisch signifikanten Änderungen im Titin-I-Band nach Stimulation mit einer hohen physiologischen Östrogenkonzentration machen eine Veränderung der Titin-basierten myokardialen Steifigkeit unwahrscheinlich. Funktionell könnten jedoch bereits die leicht erhöhten Phosphorylierungsniveaus innerhalb der PEVK-Region bei unverändertem Phosphorylierungsstatus der N2B-Region (S4010-Phosphorylierungen) eine Steifigkeitszunahme des Moleküls verursachen, die funktionell mit einer gesteigerten Kardiomyozytensteifigkeit einhergeht. Durch die funktionell erhöhten passiven Rückstellkräfte könnte die diastolische Funktion des Herzens unterschätzt werden.

## **4.10 Aktivitätszunahme Östrogen-induzierter Signalwege bei reduzierter Stimulationsdauer**

Da es sich bei PTMs häufig um sehr akute und transiente Signalprozesse handelt, besteht zudem die Möglichkeit, dass ein Teil der östradiolbasierten Effekte durch die vergleichsweise lange Inkubationsdauer maskiert wurde. Im dritten Stimulationsversuch wurden daher die akuten Effekte der Stimulantien auf die PTMs des Titins bei reduzierter Stimulationsdauer von 30 Minuten untersucht. Die Zellen wurden mit 100 nM Östradiol, Fulvestrant und kombinierter Gabe von Östrogen mit Fulvestrant inkubiert. Der Effekt der reduzierten Stimulationsdauer wurde in allen stimulierten Zellen deutlich. Allerdings konnte erneut kein signifikanter Einfluss von Östrogen auf die kardiale Titin-Phosphorylierung und die beteiligten Kinasen detektiert werden. Die um die Hälfte reduzierte Stimulationsdauer bewirkte in den relativen Phosphorylierungsergebnissen der Kinasen und den zu untersuchenden Phosphorylierungsstellen des Titins teilweise sehr starke Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchsansätzen. Unter Umständen scheint die Stimulationsdauer einen

limitierenden Effekt auf den Phosphorylierungsgrad mit maximalen Effekten bei kurzzeitiger Stimulation zu haben. Berücksichtigt werden muss allerdings die im Vergleich zum zweiten Stimulationsversuch ebenfalls deutlich erhöhte Standardabweichung.

Erneut gingen die gesteigerten PKC $\alpha$ -Aktivitäten mit einer erhöhten relativen Phosphorylierung von S12022 einher, was die Tendenzen der Ergebnisse des ersten und zweiten Stimulationsversuchs bestätigten. Durch zeitliche Veränderung der Stimulationsdauer stieg bei kombinierter Gabe von Fulvestrant und Östrogen die relative S12022-Phosphorylierung um  $103,2 \pm 44,2\%$  signifikant an ( $P = 0,034$ ). Im Gegensatz zu der Konzentrationsmenge schien die zeitliche Komponente einen deutlich höheren Einfluss bei Östradiol-stimulierten Zellen zu haben. Die Effekte des Fulvestrants schienen im Gegensatz zu Östrogen sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig zu sein.

Der zeitliche und konzentrationsabhängige Einfluss zeigte sich ebenfalls in der relativen S11878-Phosphorylierung. Mit einem signifikanten Anstieg um  $67,8 \pm 29,2\%$  bei kombinierter Gabe ( $P = 0,044$ ) ist dieser um  $31,6\%$  gegenüber der relativen Phosphorylierung des zweiten Stimulationsversuchs erhöht. Zudem stiegen die Phosphorylierungen in Fulvestrant- und Östradiol-stimulierten Zellen um  $18,9 \pm 8,1\%$  und  $36,2 \pm 31,4\%$  an. Aufgrund des vergrößerten Standardfehlers bei Östradiol-stimulierten Zellen von  $54,4\%$  bei einer n-Zahl von 3 bleibt der zeitliche Einfluss auf die erhöhte Phosphorylierung fraglich. Zur Bestätigung des zeitlichen Einflussfaktors müsste der Standardfehler durch weitere n-Zahlen minimiert werden.

Bei reduzierter Stimulationsdauer tendierten die relativen Phosphorylierungen der S4010 in allen stimulierten Versuchsansätzen zu einer Hypophosphorylierung gegenüber Kontrollen. Dies könnte möglicherweise durch eine bei reduzierter Stimulationsdauer höhere Aktivität der PP5 erklärt werden. Hamilton et al. (2004) wiesen kardioprotektive Effekte Östrogens über hochregulierte HSPs nach. Es konnte gezeigt werden, dass Östrogen einen Anstieg von HSP72 und HSP90 in Kardiomyozyten von weiblichen Ratten bewirkt (121). HSP90 aktiviert die PP5 (30), wodurch die Hypophosphorylierungen der S4010 erklärt werden könnten. Erneut zeigten die in der PEVK-Region untersuchten Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022 niedrigere relative Phosphorylierungen als die untersuchten Kinasen. Möglich könnte eine Einflussnahme der PP1 und PP2a neben der N2Bus- auf die PEVK-Regionen sein. Allerdings konnte dies nur in *in vitro* Experimenten bestätigt werden. Ob PP1 und PP2a auch in der Dephosphorylierung von kardialen Titin *in vivo* beteiligt sind, ist noch nicht bekannt.

Erneut konnte keine signifikante Änderung im elastischen Titin-I-Band nach Östrogenstimulation detektiert werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorhergegangenen Stimulationstests, sowie den Ergebnissen der Gewebeanalyse. Der Vergleich der drei Stimulationsversuche zeigt, dass der Effekt des Östrogens vor allem bei reduzierter Stimulationsdauer auftritt. Die reduzierte Stimulationsdauer gibt einen Hinweis für den Einfluss von Östrogen in einer akuten Situation. Möglicherweise könnte dieser Hormon-induzierte Mechanismus bei der Entwicklung eines Myokardinfarktes, der mit einer Mehrarbeit des Herzens verbunden ist (63), kardioprotektiv wirken.

Interessant wäre daher zu prüfen, ob signifikante Ergebnisse der Titinphosphorylierung bei noch kürzerer Stimulationsdauer auftreten. Fraglich bleibt, ob pathologische oder altersabhängige Veränderungen im Hormonstatus denkbar wären, die zu einer hormonabhängigen Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung von Titin und damit veränderter Myozytensteifigkeit führen. Hierzu findet sich keine aktuelle Studienlage. Es müsste folglich geprüft werden, ob ein Anstieg oder ein Abfall der Östrogenkonzentration außerhalb der physiologischen Range von Östrogen zu Änderungen in der Phosphorylierung des kardialen Titins führen. Die hier durchgeführten Stimulationstest wiesen allerdings keine signifikante Änderung in den Effekten von Östrogen nach Änderung der Stimulationskonzentration in physiologischer Konzentration (10 nM – 100 nM) bei längerer Inkubationsdauer von 1h nach.

## **4.11 Zusammenfassung der Stimulationsversuche und Ausblick**

Der Einsatz von 17- $\beta$ -Östradiol in physiologischer Konzentration (10nM – 100nM) erbrachte keine statistisch signifikanten Ergebnisse in Östrogen-stimulierten männlichen RCMs im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen in allen 3 Versuchsansätzen. Ebenfalls konnte kein signifikantes Ergebnis nach Änderung der Stimulationsdauer detektiert werden. Auffallend ist, dass die Effekte Östrogens eher zeit- als konzentrationsabhängig waren. Im Vergleich zu der initialen Inkubationszeit von 60 min konnten bei reduzierter Stimulationsdauer stärkere Effekte auf die hier untersuchte kardiale Titinphosphorylierung detektiert werden. Die nicht signifikanten Änderungen in der Titinphosphorylierung unterstützen möglicherweise durch die erhöhten passiven Rückstellkräfte die diastolische Funktion des Herzens. Funktionell bedeutsam ist das für die Unterstützung des Frank-Starling-Mechanismus (30, 31). Interessanterweise treten diastolische Dysfunktionen bei Frauen häufiger auf als bei Männern (122). Die bessere Unterstützung der diastolischen Funktion könnte protektiv für die Entwicklung von Kardiomyopathien bei postmenopausalen Frauen sein. Ob fehlende Sexualhormone an der Entwicklung von bestimmten Formen von Kardiomyopathien (CM) beteiligt sind, könnte anhand einer retrospektiven Studie geprüft werden. Das Auftreten von CMs könnte zwischen postmenopausalen Frauen mit und ohne Hormonersatztherapie analysiert werden. Bei möglichen Unterschieden könnten neue Therapien entwickelt werden, um durch gezielte Hormonersatztherapien unter Berücksichtigung hormoneller Nebenwirkungen ein Fortschreiten bestimmter CMs zu verlangsamen. Ob die Sexualhormone an den akuten Veränderungen der Titin-basierten Myokardsteifigkeit nach Myokardinfarkt beteiligt sind, bleibt besonders wegen nicht signifikanter Ergebnisse bei reduzierter Stimulationsdauer unklar. Auch wenn keine signifikanten Ergebnisse vorliegen, wäre eine Unterstützung der diastolischen Funktion des Herzens durch erhöhte passive Rückstellkräfte denkbar. Ferner wäre der Vergleich der Änderungen in den PTMs von Titin nach Östrogenstimulation zwischen verschiedenen Spezies interessant. Die Kardiomyozyten kleinerer Lebewesen wie Mäuse oder Ratten weisen im Vergleich

zu größeren Lebewesen wie Schweine, Hunde oder Menschen eine hohe basale kardiale Titinsteifeigkeit auf (123). Ob daher ein signifikanter Effekt nach Östrogenstimulation bei elastischeren Grundeigenschaften in den PTMs von Titin erzielt werden kann, müsste untersucht werden.

Unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Dissertation detektierten stärkeren Korrelationen von Progesteron verglichen mit Östrogen auf die PTMs des Titins wäre auch eine Analyse des Einflusses von Progesteron auf die untersuchten PTMs des Titins interessant. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von Östrogen könnte die kardialen Effekte beider Sexualhormone gegenüberstellen. Die Wirkung der Sexualhormone im kardiovaskulären System bietet ein breites Feld an Forschung. Eine genau untersuchte Wirkweise mit detailliert erforschten Signalwegen ist für beide Sexualhormone essentiell, um im kardiovaskulären System hormonelle Therapiekonzepte zu entwickeln.

## **5. Schlussfolgerung**

Insgesamt kann aus den ermittelten Ergebnissen geschlossen werden, dass die basalen Titin-Eigenschaften nicht signifikant durch das Geschlecht modifiziert werden, dass aber eine akute Veränderung nicht genomischer Östrogen-Signalisierung das Potential besitzt, die Signalwege und Funktionen von Kardiomyozyten schnell zu modulieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Jan EOLBDBA. Cardiovascular Disease. StatPearls Publishing. 2020.
2. Cheng A, Braunstein JB, Dennison C, Nass C, Blumenthal RS. Reducing global risk for cardiovascular disease: Using lifestyle changes and pharmacotherapy. *Clinical Cardiology*. 2002;25(5):205-12.
3. Gesundheit DRK-IieBiGdBf.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische\\_Erkrankungen/HKK/HKK\\_node.html](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/HKK/HKK_node.html). abgerufen am 28.09.2020.
4. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(1).
5. Mc Namara K, Alzubaidi H, Jackson JK. Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integr Pharm Res Pract*. 2019;8:1-11.
6. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur Heart J*. 2013;34(39):3028-34.
7. (Destatis) SB. Gesundheit-Todesursachen in Deutschland. 2017.
8. Gao Z, Chen Z, Sun A, Deng X. Gender differences in cardiovascular disease. *Medicine in Novel Technology and Devices*. 2019;4:100025.
9. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013;19(3):197-209.
10. Regitz-Zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. *Physiological Reviews*. 2017;97(1):1-37.
11. Pelliccia F, Limongelli G, Autore C, Gimeno-Blanes JR, Basso C, Elliott P. Sex-related differences in cardiomyopathies. *Int J Cardiol*. 2019;286:239-43.
12. Luo T, Kim JK. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Cardiomyocytes: An Overview. *Can J Cardiol*. 2016;32(8):1017-25.
13. Monteiro R, Teixeira D, Calhau C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:615917.
14. Georg Löffler PEP, Peter C. Heinrich. *Biochemie&Pathobiochemie*. 2006:873 ff.
15. Georg Löffler PEP, Peter C. Heinrich. *Biochemie&Pathobiochemie*. 2006:843 ff.
16. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*. 2004;90 Suppl 1(Suppl 1):S2-6.
17. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;308(1-2):32-8.
18. Mahmoodzadeh S, Dworatzek E. The Role of 17 $\beta$ -Estradiol and Estrogen Receptors in Regulation of Ca<sup>2+</sup> Channels and Mitochondrial Function in Cardiomyocytes. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10(310).
19. Pugach EK, Blenck CL, Dragavon JM, Langer SJ, Leinwand LA. Estrogen receptor profiling and activity in cardiac myocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;431:62-70.
20. Wang H, Zhao Z, Lin M, Groban L. Activation of GPR30 inhibits cardiac fibroblast proliferation. *Mol Cell Biochem*. 2015;405(1-2):135-48.
21. Deschamps AM, Murphy E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(5):H1806-13.
22. Patel VH, Chen J, Ramanjaneya M, Karteris E, Zachariades E, Thomas P, et al. G-protein coupled estrogen receptor 1 expression in rat and human heart: Protective role during ischaemic stress. *Int J Mol Med*. 2010;26(2):193-9.
23. Jameera Begam A, Jubie S, Nanjan MJ. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. *Bioorg Chem*. 2017;71:257-74.
24. dos Remedios C, Gilmour D. An historical perspective of the discovery of titin filaments. *Biophysical Reviews*. 2017;9(3):179-88.
25. Squire JM. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Current Opinion in Structural Biology*. 1997;7(2):247-57.
26. Wang K, McClure J, Tu A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(8):3698-702.

27. Krüger M, Linke WA. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*. 2011;286(12):9905-12.
28. Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*. 2014;114(6):1052-68.
29. Ottenheijm CA, van Hees HW, Heunks LM, Granzier H. Titin-based mechanosensing and signaling: role in diaphragm atrophy during unloading? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(2):L161-6.
30. Koser F, Loescher C, Linke WA. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *FEBS J*. 2019;286(12):2240-60.
31. Willis MS. Titin Regulation of Cardiac Stiffness: Molecular Mechanism of Diastolic Dysfunction. Elsevier SciTech Connect. 2014.
32. Hamdani WALaN. Gigantic Business Titin Properties and Function Through Thick and Thin. *Circulation Research*. 14 Mar 2014;Vol. 114, No.6:1052–68.
33. Linke WA, Krüger M. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda)*. 2010;25(3):186-98.
34. Trombitás K, Redkar A, Centner T, Wu Y, Labeit S, Granzier H. Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity. *Biophysical journal*. 2000;79(6):3226-34.
35. Eckels EC, Tapia-Rojo R, Rivas-Pardo JA, Fernández JM. The Work of Titin Protein Folding as a Major Driver in Muscle Contraction. *Annual review of physiology*. 2018;80:327-51.
36. LeWinter MM, Granzier H. Cardiac titin: a multifunctional giant. *Circulation*. 2010;121(19):2137-45.
37. Li H, Linke WA, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Kerkvliet JG, Lu H, et al. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*. 2002;418(6901):998-1002.
38. Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*. 2004;94(3):284-95.
39. Greaser M.L. BM, Warren C.M., Mozdziak P.E. . Species variations in cDNA sequence and exon splicing patterns in the extensible I-band region of cardiac titin: relation to passive tension. Springer, Dordrecht. 2003.
40. LeWinter MM, Granzier HL. Titin is a major human disease gene. *Circulation*. 2013;127(8):938-44.
41. Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophysical journal*. 1995;68(3):1027-44.
42. Linke WA, Grützner A. Pulling single molecules of titin by AFM—recent advances and physiological implications. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2008;456(1):101-15.
43. Hidalgo C, Granzier H. Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23(5):165-71.
44. LeWinter MM, Granzier HL. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;63(3):207-12.
45. Warren CM, Krzesinski PR, Campbell KS, Moss RL, Greaser ML. Titin isoform changes in rat myocardium during development. *Mechanisms of Development*. 2004;121(11):1301-12.
46. Neagoe C, Opitz CA, Makarenko I, Linke WA. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24(2-3):175-89.
47. Fukuda N, Terui T, Ishiwata S, Kurihara S. Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(5):876-81.
48. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, et al. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*. 2002;106(11):1333-41.
49. Nagueh Sherif F, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King Nicholas MP, Lahmers S, et al. Altered Titin Expression, Myocardial Stiffness, and Left Ventricular Function in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110(2):155-62.
50. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, et al. Passive Stiffness Changes Caused by Upregulation of Compliant Titin Isoforms in Human Dilated Cardiomyopathy Hearts. *Circulation Research*. 2004;95(7):708-16.
51. Borbély A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Édes I, Gavina C, et al. Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium. *Circulation Research*. 2009;104(6):780-6.

52. Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer Jean GF, Edes I, Stienen Ger JM, et al. Cardiomyocyte Stiffness in Diastolic Heart Failure. *Circulation*. 2005;111(6):774-81.
53. Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield Margaret M, et al. Protein Kinase G Modulates Human Myocardial Passive Stiffness by Phosphorylation of the Titin Springs. *Circulation Research*. 2009;104(1):87-94.
54. Krüger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006;27(5-7):435-44.
55. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 2002;90(11):1181-8.
56. Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, et al. PKC Phosphorylation of Titin's PEVK Element. *Circulation Research*. 2009;105(7):631-8.
57. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser Michael M, Neef S, dos Remedios Cristobal G, Maier Lars S, et al. Crucial Role for Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II in Regulating Diastolic Stress of Normal and Failing Hearts via Titin Phosphorylation. *Circulation Research*. 2013;112(4):664-74.
58. Kötter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Muller AE, Helling S, Marcus K, et al. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovascular Research*. 2013;99(4):648-56.
59. Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli C, Methawasin M, Hutchinson KR, Tsapralis G, et al. The multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII $\delta$ ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;54:90-7.
60. Rao V, Cheng Y, Lindert S, Wang D, Oxenford L, McCulloch AD, et al. PKA phosphorylation of cardiac troponin I modulates activation and relaxation kinetics of ventricular myofibrils. *Biophys J*. 2014;107(5):1196-204.
61. Solaro RJ, Henze M, Kobayashi T. Integration of troponin I phosphorylation with cardiac regulatory networks. *Circ Res*. 2013;112(2):355-66.
62. Kruger M, Linke WA. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(4):490-8.
63. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, et al. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 2016;119(9):1017-29.
64. Cazaubon S, Bornancin F, Parker PJ. Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C alpha. *Biochem J*. 1994;301 ( Pt 2)(Pt 2):443-8.
65. Hopf AE, Andresen C, Kötter S, Isić M, Ulrich K, Sahin S, et al. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res*. 2018;123(3):342-55.
66. Oliveira SM, Zhang YH, Solis RS, Isackson H, Bellahcene M, Yavari A, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylates cardiac troponin I and alters contractility of murine ventricular myocytes. *Circ Res*. 2012;110(9):1192-201.
67. Pugach EK, Blenck CL, Dragavon JM, Langer SJ, Leinwand LA. Estrogen receptor profiling and activity in cardiac myocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016;431(C):62-70.
68. Beale AL, Meyer P, Marwick TH, Lam CSP, Kaye DM. Sex Differences in Cardiovascular Pathophysiology: Why Women Are Overrepresented in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2018;138(2):198-205.
69. Degner K, Magness RR, Shah DM. Establishment of the Human Uteroplacental Circulation: A Historical Perspective. *Reprod Sci*. 2017;24(5):753-61.
70. DeSwiet M. The cardiovascular system. In: *Clinical Physiology in Obstetrics*, (Eds F. Hytten & G. Chamberlain) pp. 3-38. . Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1991.
71. DeSwiet M. The physiology of normal pregnancy. In: *Hypertension in Pregnancy Vol. 10*. (Ed. P. C. Rubin) pp. 1-9. . Elsevier Science Publishers, New York. 1988.
72. Ferris TF. The pathophysiology of toxemia and hypertension during pregnancy. *Drugs*, 25, 198-205 1983.
73. Conrad KP, Barrera, S. A., Friedmann, P. A. & Schmidt, V. M. . Evidence for attenuation of myoinositol uptake, phosphoinositide turnover and inositol phosphate production in aortic vasculature of rats during pregnancy *Journal of Clinical Investigation*, 87, 1700-1709 1991.

74. Davidge SM, M. . Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from the pregnant rat *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167, 1691-1698 1992.
75. Heesch CM, Rogers RC. Effects of pregnancy and progesterone metabolites on regulation of sympathetic outflow. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995;22(2):136-42.
76. Stumpf WE. Steroid hormones and the cardiovascular system: direct actions of estradiol, progesterone, testosterone, gluco- and mineralocorticoids, and soltriol [vitamin D] on central nervous regulatory and peripheral tissues. *Experientia*, 46, 13-25. 1990.
77. Maggi AP, J. . Progesterone and estrogens in rat brain: modulation of GABA receptor activity *European Journal of Pharmacology*, 103, 165-168. 1984.
78. Eghbali M, Wang Y, Toro L, Stefani E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16(8):285-91.
79. Guo W, Sun M. RBM20, a potential target for treatment of cardiomyopathy via titin isoform switching. *Biophys Rev*. 2018;10(1):15-25.
80. Linke WA. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annu Rev Physiol*. 2018;80:389-411.
81. Steger RW, Peluso JJ. Effects of age on hormone levels and in vitro steroidogenesis by rat ovary and adrenal. *Exp Aging Res*. 1982;8(3-4):203-8.
82. Ström JO, Theodorsson A, Ingberg E, Isaksson IM, Theodorsson E. Ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol replacement in rats and mice: a visual demonstration. *J Vis Exp*. 2012(64):e4013.
83. Hamdani N, Herwig M, Linke WA. Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes. *Biophys Rev*. 2017;9(3):225-37.
84. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, et al. Crucial role for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*. 2013;112(4):664-74.
85. Kötter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Müller AE, Helling S, Marcus K, et al. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*. 2013;99(4):648-56.
86. Nilsson ME, Vandenput L, Tivesten Å, Norlén AK, Lagerquist MK, Windahl SH, et al. Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology*. 2015;156(7):2492-502.
87. Döhler KD, Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*. 1975;97(4):898-907.
88. Barkley MS, Geschwind, II, Bradford GE. The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. *Biol Reprod*. 1979;20(4):733-8.
89. Morrissy S, Xu B, Aguilar D, Zhang J, Chen QM. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell*. 2010;9(5):799-809.
90. dos Santos RL, da Silva FB, Ribeiro RF, Jr., Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;18(2):89-103.
91. Feridooni HA, MacDonald JK, Ghimire A, Pyle WG, Howlett SE. Acute exposure to progesterone attenuates cardiac contraction by modifying myofilament calcium sensitivity in the female mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312(1):H46-h59.
92. Shaikh AA. Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod*. 1971;5(3):297-307.
93. Morishige WK, Pepe GJ, Rothchild I. Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocrinology*. 1973;92(5):1527-30.
94. Turi A, Kiss AL, Müllner N. Estrogen downregulates the number of caveolae and the level of caveolin in uterine smooth muscle. *Cell Biol Int*. 2001;25(8):785-94.
95. Jazbutyte V, Stumpner J, Redel A, Lorenzen JM, Roewer N, Thum T, et al. Aromatase inhibition attenuates desflurane-induced preconditioning against acute myocardial infarction in male mouse heart in vivo. *PLoS One*. 2012;7(8):e42032.
96. Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(3):329-42.
97. Arnal JF, Lenfant F, Metivier R, Flouriot G, Henrion D, Adlanmerini M, et al. Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol Rev*. 2017;97(3):1045-87.

98. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, et al. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2016;119(9):1017-29.
99. Sheldahl LC, Shapiro RA, Bryant DN, Koerner IP, Dorsa DM. Estrogen induces rapid translocation of estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, to the neuronal plasma membrane. *Neuroscience*. 2008;153(3):751-61.
100. Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):98-112.
101. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263(1):257-62.
102. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;265-266:138-42.
103. Han G, White RE. G-protein-coupled estrogen receptor as a new therapeutic target for treating coronary artery disease. *World J Cardiol*. 2014;6(6):367-75.
104. Georg Löffler PEP, Peter C. Heinrich. *Biochemie und Pathobiochemie 8.Auflage*. Springer-Lehrbuch. 2006:1011 ff.
105. Lowe DA, Kararigas G. Editorial: New Insights into Estrogen/Estrogen Receptor Effects in the Cardiac and Skeletal Muscle. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:141.
106. Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, Burai R, Corona C, Ramesh C, et al. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol*. 2007;2(8):536-44.
107. Dziubak A, Wójcicka G, Wojtak A, Bełtowski J. Metabolic Effects of Metformin in the Failing Heart. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
108. Lee H-W, Eghbali-Webb M. Estrogen Enhances Proliferative Capacity of Cardiac Fibroblasts by Estrogen Receptor- and Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1998;30(7):1359-68.
109. Shen T, Ding L, Ruan Y, Qin W, Lin Y, Xi C, et al. SIRT1 functions as an important regulator of estrogen-mediated cardiomyocyte protection in angiotensin II-induced heart hypertrophy. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:713894.
110. Dong WH, Chen JC, He YL, Xu JJ, Mei YA. Resveratrol inhibits K(v)2.2 currents through the estrogen receptor GPR30-mediated PKC pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;305(5):C547-57.
111. Gray CB, Heller Brown J. CaMKII $\delta$  subtypes: localization and function. *Front Pharmacol*. 2014;5:15.
112. Tran QK, Firkins R, Giles J, Francis S, Matnishian V, Tran P, et al. Estrogen Enhances Linkage in the Vascular Endothelial Calmodulin Network via a Feedforward Mechanism at the G Protein-coupled Estrogen Receptor 1. *J Biol Chem*. 2016;291(20):10805-23.
113. Zhang T, Brown JH. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):476-86.
114. Ma Y, Cheng WT, Wu S, Wong TM. Oestrogen confers cardioprotection by suppressing Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Br J Pharmacol*. 2009;157(5):705-15.
115. Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK, et al. A Novel Mechanism Involving Four-and-a-half LIM Domain Protein-1 and Extracellular Signal-regulated Kinase-2 Regulates Titin Phosphorylation and Mechanics\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(35):29273-84.
116. Holm A, Nilsson BO. Identification and characterization of new mechanisms in vascular oestrogen signalling. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;113(5):287-93.
117. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;389(1-2):71-83.
118. Banciu A, Banciu DD, Mustaciosu CC, Radu M, Cretoiu D, Xiao J, et al. Beta-Estradiol Regulates Voltage-Gated Calcium Channels and Estrogen Receptors in Telocytes from Human Myometrium. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
119. Juan SH, Chen JJ, Chen CH, Lin H, Cheng CF, Liu JC, et al. 17 $\beta$ -estradiol inhibits cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression within vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(3):H1254-61.

120. Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK, et al. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem*. 2012;287(35):29273-84.
121. Hamilton KL, Mbai FN, Gupta S, Knowlton AA. Estrogen, heat shock proteins, and NFkappaB in human vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(9):1628-33.
122. Ebong IA, Watson KE, Goff DC, Jr., Bluemke DA, Srikanthan P, Horwich T, et al. Age at menopause and incident heart failure: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Menopause*. 2014;21(6):585-91.
123. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, et al. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*. 2000;86(1):59-67.

## 7. Anhang

Für die in der Dissertation verwendeten Abbildungen 7, 9 und 11 wurden die notwendigen Lizenzen eingeholt. Im Folgenden wird für jede Abbildung die notwendige Lizenz beigefügt.

### 1. Lizenz für die Abbildung 7:

SPRINGER NATURE LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Dec 28, 2021

---

This Agreement between Herz-Kreislauf Physiologie II HHU Düsseldorf -- Julian Karpf ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5217760000693
License date	Dec 28, 2021
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Pflügers Archiv European Journal of Physiology
Licensed Content Title	Pulling single molecules of titin by AFM—recent advances and physiological implications
Licensed Content Author	Wolfgang A. Linke et al
Licensed Content Date	Dec 6, 2007
Type of Use	Thesis/Dissertation

---

## 2. Lizenz für die Abbildung 9:

### WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 29, 2021

---

This Agreement between Herz-Kreislauf Physiologie II HHU Düsseldorf -- Julian Karpf ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	5218261471715
License date	Dec 29, 2021
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Circulation Research
Licensed Content Title	Gigantic Business
Licensed Content Author	Wolfgang A. Linke, Nazha Hamdani
Licensed Content Date	Mar 14, 2014
Licensed Content Volume	114

---

### 3. Lizenz für die Abbildung 11:

#### WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 31, 2021

---

This Agreement between Herz-Kreislauf Physiologie II HHU Düsseldorf -- Julian Karpf ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	5219270308537
License date	Dec 31, 2021
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Circulation Research
Licensed Content Title	Gigantic Business
Licensed Content Author	Wolfgang A. Linke, Nazha Hamdani
Licensed Content Date	Mar 14, 2014
Licensed Content Volume	114

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger, für die hervorragende Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ich danke ihr für die lehrreichen Erfahrungen und Erkenntnisse, die ich während meines wissenschaftlichen Arbeitens unter Ihrer Supervision sammeln durfte. Ferner bedanke ich mich für den konstruktiv fachlichen Austausch, ihre ständige Erreichbarkeit zur schnellen Klärung etwaiger Fragen, ihre Unterstützung bei der Posterpräsentation sowie die Aufnahme und Weiterbildung in ihre Arbeitsgemeinschaft. Es war eine unvergessliche Zeit, die mir immer in wertvoller Erinnerung bleiben wird.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Zweitkorrektor, Herr Prof. Dr. med. Joachim Schmitt, für die jährlichen Fortschritts- und Feedbackgespräche sowie die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereich 1116 sowie für Ihre Zeit zur Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt vor allem dem Bildungsprogramm des SFB 1116, das mir eine strukturierte Doktorandenausbildung ermöglicht hat. Hierdurch konnten sich meine wissenschaftlichen Fähigkeiten weiterentwickeln, was mir für mein zukünftiges wissenschaftliches Arbeiten enorm weiterhelfen wird.

Zusätzlich bedanke ich mich für die Gewährung des Stipendiums im Programm SFB 1116, welches mir ermöglicht hat, mich vollständig auf die Laborarbeiten und Durchführung zahlreicher Experimente zu fokussieren.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Dr. rer. nat. Sebastian Kötter, der mir bei schwierigen Konzentrationsberechnung tatkräftig zu Seite stand und mir die Ergebnisse der Kraftmessung freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Dr. rer. nat. David Barbosa und Frau Sabine Bongardt danke ich für die fachliche Unterstützung, die Einarbeitung in das experimentelle Arbeiten im Labor, die Zusammenarbeit bei der Isolation von adulten Rattenkardiomyozyten, die Einführung in die spezifischen Auswertungsprogramme sowie die netten Gespräche im gemeinsamen Büro.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für ihre Geduld, Ermutigungen und Zusprüche während der Ausarbeitung der Arbeit bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei meiner Mutter Tamara und meinem Vater Rudolf, die immer an mich geglaubt und mich in jeglicher Form unterstützt haben. Für ihre Motivation und ihren Optimismus vor allem in Zeiten der Verzweiflung bin ich sehr dankbar. Meiner Schwester Alina möchte ich an dieser Stelle besonders für Ihre Unterstützung bei technischen Problemen und ihre generelle grenzenlose Unterstützung danken. Bei meinen besten Freunden, Felix und Katharina, bedanke ich mich für den gemeinsamen wissenschaftlichen Austausch.