

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

DISSERTATION

Die Identifikation und Charakterisierung von Myosin Light Chain  
4 und Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase als neuartige  
Interaktionspartner des Östrogenrezeptor alpha

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam A. Schanz

aus Meißen

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. Regitz-Zagrosek.....  
                          2. Prof. Dr. med. C. Grohé.....  
                          3. Prof. Dr. med. Geibel-Zehender.....

Datum der Promotion: .....30.11.2012.....

Meiner Familie und meinen Großeltern

**Inhaltsverzeichnis**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... VIII**

**1 EINLEITUNG ..... 1**

1.1 Der Einfluss der Östrogene auf das Myokard ..... 1

1.2 Östrogenrezeptoren: ER $\alpha$  und ER $\beta$  ..... 2

1.2.1 Molekularer Aufbau des ER $\alpha$  ..... 3

1.2.2 ER $\alpha$  im Myokard ..... 4

1.3 Protein-Interaktionspartner des ER $\alpha$  ..... 4

1.4 MCAD und seine Bedeutung im Energiestoffwechsel ..... 6

1.5 Das Muskelprotein Myosin Light Chain 4 ..... 7

1.6 Aufgabenstellung ..... 9

**2 MATERIALIEN ..... 11**

2.1 Laborgeräte ..... 11

2.2 Verbrauchsmaterialien ..... 11

2.3 Kits ..... 12

2.4 Chemikalien ..... 12

2.5 Enzyme ..... 13

2.6 Antikörper ..... 13

2.7 Kulturen und Medien ..... 14

2.7.1 *E. coli* Stämme und Medien ..... 14

2.7.2 Hefe-Stämme und Medien ..... 15

2.7.3 Zelllinien und Medien ..... 17

2.8 Vektoren ..... 18

2.8.1 „Yeast Two Hybrid“ Vektoren ..... 18

2.8.2 Plasmidkonstrukte ..... 20

2.9 Oligonukleotide ..... 20

2.9.1	Primer für die Synthese der MCAD-Expressionskonstrukte .....	20
2.9.2	Primer zur Sequenzanalyse der rekombinanten Plasmide.....	21
<b>2.10</b>	<b>Probenmaterial und Patientengut .....</b>	<b>21</b>
<b>2.11</b>	<b>Software .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Kultivierung und Konservierung von Hefen .....	23
3.1.2	Kultivierung und Ernte von <i>E.coli</i> Bakterien.....	23
3.1.3	Herstellung von Gefrierkulturen .....	23
3.1.4	Transformation von Bakterien .....	23
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>24</b>
3.2.1	Kultivierung von AC16 Zellen .....	24
3.2.2	Passagieren von AC16 Zellen.....	24
3.2.3	Herstellung von Gefrierkulturen und Abtauen der AC16 Zellen .....	25
3.2.4	Stimulation von AC16 Zellen .....	25
3.2.5	Ernte der AC16 Zellen .....	25
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.3.1	Extraktion von Plasmid-DNA .....	26
3.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA.....	26
3.3.3	Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel .....	26
3.3.4	Amplifikation von DNA.....	26
3.3.5	Sequenzierung von DNA .....	27
<b>3.4</b>	<b>Methodenspektrum zur Klonierung.....</b>	<b>27</b>
3.4.1	DNA-Restriktionsanalyse.....	27
3.4.2	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel.....	28
3.4.3	Einfügen einer Restriktionsschnittstelle in eine DNA Sequenz .....	28
3.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA.....	28
<b>3.5</b>	<b>Methodenspektrum für das „Yeast Two Hybrid“ System .....</b>	<b>29</b>
3.5.1	Prinzip des „Yeast-Two-Hybrid“ Systems .....	29
3.5.2	1:1 Retransformation im „Yeast-Two-Hybrid“-System .....	29
3.5.3	Herstellung der MYL4 <i>prey</i> -Fusionskonstrukte .....	30
3.5.4	Herstellung der MCAD- <i>prey</i> -Fusionskonstrukte .....	31

## Inhaltsverzeichnis

---

3.5.5	Integration der <i>prey</i> -Fusionskonstrukte in die Hefe.....	32
3.5.6	Überprüfung der <i>prey</i> -Vektoren auf Autoaktivität.....	32
3.5.7	$\beta$ -Galaktosidase-Assay.....	33
<b>3.6</b>	<b>Methoden der Proteinbiochemie .....</b>	<b>33</b>
3.6.1	Extraktion von Proteinen aus humanen Herzproben .....	33
3.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.6.4	Western Blot.....	34
3.6.5	Immunodetektion im Westernblot.....	35
<b>3.7</b>	<b>Co-Immunopräzipitation .....</b>	<b>35</b>
3.7.1	Prinzip der Co-Immunopräzipitation (CoIP).....	35
3.7.2	CoIP von ER $\alpha$ , MCAD und MYL4 .....	36
<b>3.8</b>	<b>Immunofluoreszenz .....</b>	<b>37</b>
3.8.1	Immunohistochemie (IHC-P) .....	37
3.8.2	Immunocytochemie (ICC) .....	38
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Bestätigung der putativen Interaktionspartner im „Yeast-Two-Hybrid“ System.....</b>	<b>41</b>
4.1.1	Konstruktion der <i>Prey</i> -Fusionsvektoren.....	41
4.1.2	ER $\alpha$ interagiert mit MCAD und MYL4 im 1:1 „Yeast-Two-Hybrid“ Retransformationsversuch.....	43
4.1.3	Identifizierung der interagierenden Domänen des ER $\alpha$ mit MCAD und MYL4.....	45
4.1.4	ER $\alpha$ interagiert mit dem N-terminalen Bereich der MYL4.....	46
4.1.5	Bestätigung der Interaktion von ER $\alpha$ im $\beta$ -Galaktosidase Assay .....	49
<b>4.2</b>	<b>Die spezifische Interaktion von ER<math>\alpha</math> mit MCAD und ER<math>\alpha</math> mit MYL4 im humanen Herzen.....</b>	<b>51</b>
4.2.1	MCAD, MYL4 und ER $\alpha$ werden im humanen Myokard exprimiert.....	51
4.2.2	MCAD und ER $\alpha$ interagieren im humanen Myokard .....	53
4.2.3	MYL4 und ER $\alpha$ interagieren im humanen Myokard .....	54
<b>4.3</b>	<b>Lokalisation und Co-Lokalisation von ER<math>\alpha</math> und Interaktionspartnern MCAD und MYL4 im humanen Herzen</b>	<b>55</b>
4.3.1	Immunofluoreszenzanalysen am humanen Myokard .....	55
4.3.2	Lokalisation von MCAD im humanen Myokard .....	56
4.3.3	Die Co-Lokalisation von ER $\alpha$ und MCAD im humanen Atrium .....	56
4.3.4	Lokalisation von MYL4 in humanem Atrium.....	57
4.3.5	Die Co-Lokalisation von ER $\alpha$ und MYL4 in humanem Atrium.....	59

<b>4.4 Nachweis der Co-Lokalisation von ER<math>\alpha</math> mit MCAD und MYL4 in der humanen Kardiomyozytenzelllinie AC16</b>	<b>60</b>
4.4.1 Östrogen moduliert die Lokalisation von MCAD, MYL4 und ER $\alpha$ .....	61
4.4.2 Lokalisation von ER $\alpha$ und MCAD in Mitochondrien von AC16 Zellen .....	63
4.4.3 E2 vermittelte Co-Lokalisation von MCAD und ER $\alpha$ im Zytoplasma .....	65
4.4.4 Co-Lokalisation von MYL4 und ER $\alpha$ in Zytoplasma und Zellkern der AC16 Zellen .....	67
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 Rolle der Östrogenrezeptoren im gesunden und kranken Herzen .....</b>	<b>71</b>
<b>5.2 Nachweis der Interaktion des humanen ER<math>\alpha</math> mit MCAD und MYL4 im „Yeast-Two-Hybrid“ .....</b>	<b>72</b>
<b>5.3 Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von ER<math>\alpha</math> mit MYL4 .....</b>	<b>75</b>
5.3.1 MYL4 verbessert die Kontraktilität des Myokards .....	75
5.3.2 Die Rolle der Östrogene in der Muskelfunktion.....	76
5.3.3 ER $\alpha$ beeinflusst die Expression von MYL4.....	80
<b>5.4 ER<math>\alpha</math> und MCAD interagieren im humanen Myokard .....</b>	<b>82</b>
5.4.1 ER $\alpha$ interagiert mit MCAD in Mitochondrien von AC16 Zellen .....	82
5.4.2 Die Bedeutung des ER $\alpha$ für die mitochondriale Funktion.....	83
5.4.3 Bedeutung der MCAD im Energiestoffwechsel des humanen Myokards .....	84
<b>5.5 Bedeutung der Interaktion von ER<math>\alpha</math> und MCAD .....</b>	<b>84</b>
<b>5.6 Hypothetisches Modell zur Interaktion des ER<math>\alpha</math> mit MCAD und MYL4 .....</b>	<b>86</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>87</b>
<b>7 LITERATUR .....</b>	<b>89</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>9 ANHANG .....</b>	<b>98</b>
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	98
9.2 Tabellenverzeichnis .....	99
<b>10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>101</b>
<b>11 LEBENS LAUF.....</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
3-AT	3-Aminotriazol
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
<i>bideest.</i>	<i>bideestillata</i> (lat.)
bp	base pairs (engl.)
bzw.	beziehungsweise
BSA	bovine serum albumin (engl.)
ca.	circa
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (engl.)
cm	Zentimeter
C (-Terminus)	Carboxy (-Terminus)
Cy-3	Carbocyanin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DCM	dilative cardiomyopathy (engl.)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	17 $\beta$ -Östradiol
ECL	Enhanced Chemiluminescence (engl.)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER $\alpha$	Estrogen Receptor alpha (engl.)
ERE	Estrogen Responsive Element (engl.)
<i>et al.</i>	et alii (lat.) - und andere
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Full length (engl.)
g	Erdbeschleunigung
GAL4-AD	GAL4 Aktivierungsdomäne
GAL4-DBD	GAL4-DNA-Bindungsdomäne
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HRP	horseradish peroxidase (engl.)
ICC	Immunocytochemie
IHC(-P)	Immunohistochemie(-Paraffinschnitte)
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kD / kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium

M	Molarität
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger -Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
MHC	Myosinschwerkette
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NGS	Normal Goat Serum (engl.)
N (-Terminus)	Amino (-Terminus)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuklease
rpm	Drehzahl pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SHR	Spontan Hypertensive Ratten
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tm	Temperaturmaximum
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
usw.	und so weiter
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumenäquivalent
vs.	Versus
WB	Western Blot
w/o	with out (engl.)
w/v	weight per volume (engl.)
z. B.	zum Beispiel



## 1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen bilden in Industrienationen wie Deutschland die führende Ursache für Morbidität und Mortalität (Gesundheits-Berichterstattung des Bundes, Gesundheit in Deutschland, Kapitel 1.4.2, <http://www.gbe-bund.de>, Zugriff 08/2010). Allerdings sind Frauen im Vergleich zum männlichen Geschlecht hiervon um etwa eine Dekade verzögert betroffen.<sup>1, 2</sup> In der Framingham-Studie, einer prospektiven Kohortenstudie, 1948 im gleichnamigen Ort in den USA mit 5209 Teilnehmern initiiert, wurden als eine der ersten Studien Daten zu Geschlechterunterschieden für Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhoben.<sup>3</sup> Eine entscheidende Beteiligung an der Ausprägung dieser Geschlechterunterschiede wird den weiblichen Geschlechtshormonen, den Östrogenen, zugeschrieben.

Die Östrogene wie  $17\beta$ -Östradiol gehören zur Familie der Steroidhormone und werden von geschlechtsreifen Frauen primär in den Ovarien und von Männern durch aromatische Umwandlung des Testosterons in den Testes produziert.<sup>4, 5</sup> Geringe Mengen produzieren beide Geschlechter außerdem in Skelettmuskel und Fettgewebe.<sup>6</sup> In einer Studie von Grohé *et al.* konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten in der Lage sind, Östrogen aus Vorläuferhormonen zu synthetisieren.<sup>7</sup> Nach Einsetzen der Menopause wird Östrogen hauptsächlich außerhalb der Ovarien synthetisiert, der weibliche Östrogenspiegel fällt deutlich ab und entspricht dann in etwa den bei Männern gemessenen Werten.<sup>1</sup>

Östrogene sind aber weit mehr als Geschlechtshormone. Sie spielen im Organismus eine entscheidende Rolle bei der Regulation komplexer physiologischer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel. Verschiedene Studien zeigen einen Einfluss des Östrogens auf Knochenmetabolismus und Lipidstoffwechsel, kognitive Funktionen und das kardiovaskuläre System und konnten somit neben den Fortpflanzungsorganen auch den Bewegungsapparat, das Nervensystem und das Herz-Kreislaufsystem als Zielgewebe des Geschlechtshormons identifizieren.<sup>8, 9, 10, 11, 12-14</sup>

### 1.1 Der Einfluss der Östrogene auf das Myokard

Klinische Beobachtungen im Rahmen der Framingham-Studie zeigten für postmenopausale Frauen ein ungleich höheres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, als für prämenopausale Frauen gleichen Alters.<sup>3</sup> Gleichfalls verschwindet nach dem Eintritt der Menopause der weibliche Geschlechtervorteil gegenüber den Männern in der Ausprägung der koronaren Herzerkrankung.<sup>15</sup> Parker *et al.* zeigten in der 2009 publizierten ‚Nurse`s Health Study`, dass eine bilaterale

Ovarektomie mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankung vergesellschaftet ist. Dieser Effekt war bei jungen (prämenopausalen) Frauen unter 50 Jahren besonders ausgeprägt.<sup>16</sup> Im Gegensatz dazu konnte die Hormon-Ersatz Therapie keinen präventiven Effekt auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen in postmenopausalen Frauen zeigen.<sup>17</sup> Diese Beobachtungen begründeten ein reges Interesse an der Rolle des Östrogens im menschlichen Herzen.

Zahlreiche tierexperimentelle Studien an ovariectomierten Ratten und Mäusen konnten die klinischen Beobachtungen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden bestätigen. Es wurde eine präventive Wirkung des Östrogens gegenüber der Entwicklung kardialer Hypertrophie in einem Modell mit induzierter Aorten-Stenose<sup>18</sup> sowie die Verbesserung der kardialen Gesamtleistung in spontan hypertensiven Ratten (SHR)<sup>19</sup> beschrieben. Andere Studien konnten zeigen, dass Östrogen die Effekte von Verletzungen auf das Gefäßsystem abmildern kann und dass der Einfluss des Östrogens zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit des Myokards gegenüber ischämiebedingter Schädigung führt.<sup>20, 21</sup> Mendelsohn *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass 17 $\beta$ -Östradiol die endothelial vermittelte Vasodilation verbessert sowie eine Vasodilation der Koronargefäße induzieren kann. Dies wird durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch eine Östrogenrezeptor alpha (ER $\alpha$ ) abhängige Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) vermittelt.<sup>13, 22</sup> Eine weitere Studie demonstrierte den Einfluss des Östrogens auf das Angiotensin-Renin System. Untersuchungen an SHR zeigten den Verlust der protektiven Wirkung des eingesetzten *Angiotensin Converting Enzyme*-Inhibitors in ovariectomierten Tieren, welcher unter Östrogensubstitution aufhebbar war.<sup>23</sup> In humanen Myozyten aktiviert Östrogen den Protein Kinase B/ AKT Signalweg, welcher zur AKT-abhängigen Phosphorylierung weiterer Faktoren führt, die wiederum anti-apoptotische und anti-hypertrophe Effekte vermitteln.<sup>24, 25</sup>

### **1.2 Östrogenrezeptoren: ER $\alpha$ und ER $\beta$**

Die biologische Wirkung der Östrogene wird vorwiegend über spezifische Rezeptoren, Östrogenrezeptor alpha (ER $\alpha$ ) und beta (ER $\beta$ ), vermittelt.

ER $\alpha$  wie auch ER $\beta$  gehören zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und agieren als hormonregulierte Transkriptionsfaktoren.<sup>26</sup> In Abwesenheit von Östrogen liegen die Rezeptoren zum größten Teil inaktiv im Komplex mit weiteren Proteinen wie dem Hitzeschockprotein Hsp90 vor. Die Bindung von Östrogen bewirkt eine Aktivierung und Konformationsänderung des Rezeptors. Dies führt zur Dissoziation aus dem Komplex und legt den Kontaktbereich für die Rezeptor-Dimerisation frei. Der aktivierte Rezeptor bindet als Homo- oder Heterodimer an spezifische Motive, sogenannte *Estrogen-Response-Elements* (ERE) innerhalb des Promoters des

Zielgens und reguliert im Zusammenspiel mit weiteren Co-Faktoren die Transkription der Zielgene. Auf diesem Wege werden genomische Effekte des ER $\alpha$  vermittelt.<sup>27</sup>

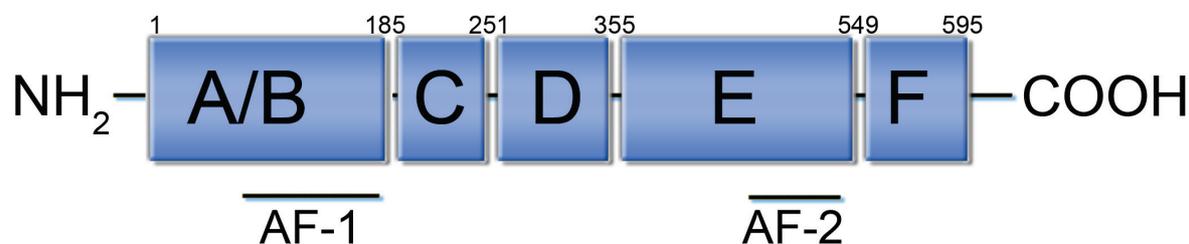
Darüber hinaus können Östrogene über die Aktivierung der Östrogenrezeptoren Signalwege außerhalb des Zellkernes beeinflussen. Diese sogenannten nicht-genomischen Effekte des Östrogens werden durch membranständige bzw. zytoplasmatische Östrogenrezeptoren vermittelt, welche mit weiteren zytoplasmatischen Proteinen interagieren.<sup>28, 29, 30</sup> Inzwischen ist eine Vielzahl von Mechanismen bekannt, über welche östrogengebundene Östrogenrezeptoren zytoplasmatische Signalkaskaden aktivieren können. Beispiele hierfür liefern die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweges oder G-Protein gekoppelter Signalwege durch Östrogen.<sup>9, 27, 25, 28, 31</sup>

Da sich die vorliegende Arbeit auf die Funktion von ER $\alpha$  im Herzen fokussiert, wird dieser im Folgenden detaillierter beschrieben.

### 1.2.1 Molekularer Aufbau des ER $\alpha$

Das ER $\alpha$ -kodierende Gen besteht aus acht Exons, die sich über mehr als 140 kb auf Chromosom 6 erstrecken. Das entstehende Transkript kodiert für ein 595 Aminosäuren langes Protein, welches mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa als klassischer Östrogenrezeptor angesehen wird. Zusätzlich zu dem klassischen 66 kDa ER $\alpha$  sind weitere kleinere Isoformen, 36 kDa (ER $\alpha$ -36) und 46 kDa (ER $\alpha$ -46), im humanen Gewebe beschrieben worden.<sup>32, 33</sup> Ropero *et al.* berichteten von einer 46 kDa Isoform im Myokard von Ratten, die vor allem membrangebunden lokalisiert wurde.<sup>34</sup>

Das ER $\alpha$ -Protein setzt sich aus sechs funktionellen Domänen zusammen, die mit Buchstaben von A bis F benannt sind. Die einzelnen Domänen können vier unabhängige Funktionsdomänen zugeordnet werden, die miteinander in Interaktion stehen:



**Abbildung 1: ER $\alpha$ .** Die verschiedenen funktionellen Domänen des ER $\alpha$  mit den designierten Funktionen sind schematisch dargestellt. Die Zahlen stellen die Positionen der Domänen innerhalb des Rezeptors in Aminosäuren dar. Erläuterungen siehe nachfolgender Text. AF: Aktivierungsfunktion.

Die N-terminale A/B-Domäne ist eine unter den verschiedenen nukleären Rezeptoren hoch variable Region, was Sequenz und Länge betrifft. Sie enthält die Transaktivierungsfunktion (AF-1), welche die ligandenunabhängige Aktivierung des ER $\alpha$  ermöglicht.<sup>35</sup> Der 46 kDa Isoform des ER $\alpha$  fehlt diese Domäne.

Die C-Domäne beinhaltet die DNA-Bindungsdomäne und ist eine unter den nukleären Rezeptoren hoch konservierte Region, die zwei Zinkfinger-Motive enthält. Diese dienen der Identifikation einer palindromischen Nukleotidsequenz innerhalb der DNA, die auch als ‚*Estrogen Response Element*‘ (ERE) bezeichnet wird und eine spezifische DNA-Bindung des Rezeptors ermöglicht.<sup>36</sup>

Die D-Domäne ist ein kurzes Fragment zwischen DNA-Bindungsdomäne und Ligandenbindungsdomäne und wird deshalb als *Hinge*-Domäne bezeichnet. Diese ermöglicht dem Rezeptor die Konformationsänderung nach Ligandenbindung.

C-terminal schließt mit der E/F Domäne die Ligandenbindungsdomäne an. Diese gilt als hoch konserviert innerhalb der nukleären Rezeptoren und enthält die ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion AF-2 sowie eine Ligandenbindungstasche, welche die Interaktion mit einer Vielzahl von Co-Faktoren ermöglicht.<sup>37, 38</sup>

### 1.2.2 ER $\alpha$ im Myokard

Entsprechend seiner biologischen Rolle wurde ER $\alpha$  in einer Vielzahl von Geweben und Zellen nachgewiesen, darunter das Herz-Kreislaufsystem.<sup>39, 40, 9</sup>

Im humanen Myokard werden Östrogenrezeptoren in verschiedenen Zellen exprimiert. ER $\alpha$  konnte in glatter Gefäßmuskulatur, in Endothelzellen sowie in kardialen Myozyten und Fibroblasten identifiziert werden. In Myozyten des menschlichen Herzens wird ER $\alpha$  im Zellkern, im Zytoplasma, in Membranen und den Glanzstreifen exprimiert.<sup>39, 41</sup>

## 1.3 Protein-Interaktionspartner des ER $\alpha$

Die vielfältigen Wirkungen von 17 $\beta$ -Östradiol im kardiovaskulären System lassen sich durch eine Vielzahl von zellspezifischen Interaktionen des Östrogenrezeptors mit anderen Proteinen erklären.

Protein-Protein-Interaktionen stellen die Basis für die Vermittlung spezifischer Effekte des Östrogens auf zellulärer Ebene dar. ER $\alpha$  brauchen die ligandenabhängige Interaktion mit anderen

Transkriptionsfaktoren bzw. regulatorischen Proteinen, um intrazelluläre Signal-Transduktionswege zu aktivieren.<sup>28</sup>

Die Interaktion des ER $\alpha$  mit zellspezifischen Proteinen schafft ein großes Netzwerk an möglichen zellspezifischen Funktionen und Wirkungsmechanismen. Werden diese Interaktionspartner identifiziert, ermöglicht dies die Einordnung in biochemische Zusammenhänge und Signalwege. Auf diesem Wege werden neue Erkenntnisse zur Wirkungsweise der Östrogenrezeptoren gewonnen, die Aufschluss über molekulare Mechanismen der Östrogenwirkung im Myokard geben können.

Beispiele für die Aktivierung verschiedener Signalwege durch ligandenabhängige Protein-Protein-Interaktionen des ER $\alpha$  sind nachfolgend aufgelistet:

1. ER $\alpha$  bindet ligandenabhängig an die regulatorische Untereinheit p85 der Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K). Unter Stimulation mit Östrogen wird die PI3 Kinase aktiviert und führt über weitere Signalkaskaden zur Freisetzung von NO und Vasodilatation.<sup>25</sup>
2. Calveolin-1 aktiviert in direkter Interaktion mit ER $\alpha$  den Östrogenrezeptor und könnte diesen ligandenunabhängig regulieren.<sup>42</sup>
3. PELP-1 konnte als Interaktionspartner des ER $\alpha$  identifiziert werden, der LxxLL-Motive und PxxP-Motive enthält und darüber die Interaktion des ER $\alpha$  mit SH3 Domänen der Src Tyrosin-Kinasen und der P85 Untereinheit der PI3K vermittelt.<sup>43,44</sup>
4. 17 $\beta$  Hydroxysteroid Dehydrogenase interagiert mit ER $\alpha$  und zeigt einen möglichen Mechanismus, über welchen ER $\alpha$  in die Regulation intrazellulärer Östrogenlevel involviert ist.<sup>45</sup>
5.  $\beta$ -Catenin interagiert auf direktem Wege mit ER $\alpha$  und stellt eine mögliche Verbindung zwischen Wnt- und Östrogen-Signalwegen dar.<sup>46</sup> Diese Interaktion konnte im Bereich der Glanzstreifen des humanen Myokards lokalisiert werden.<sup>39</sup>
6. Calveolin-3 interagiert in Anwesenheit von Östrogen mit ER $\alpha$ . Dies konnte in Kardiomyozyten neonataler wie adulter Ratten gezeigt werden und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Connexin43 im ischämisch geschädigten Herzen.<sup>47</sup>

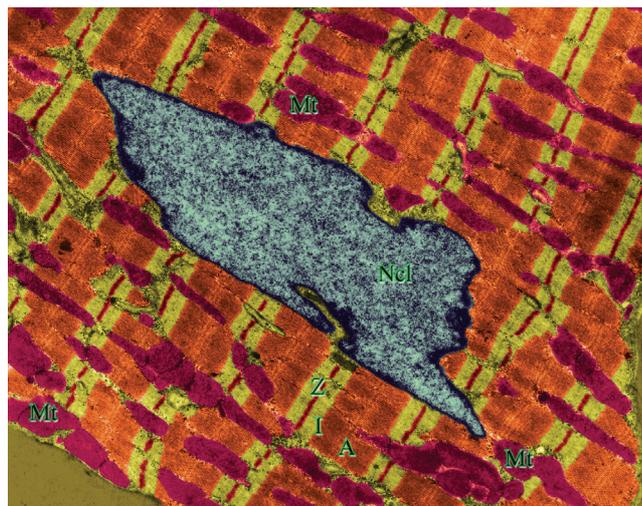
Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek konnten in einem „Yeast-Two-Hybrid“ Assay die Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) und die atriale Myosin Light Chain (MYL4) als putative Interaktionspartner des ER $\alpha$  identifizieren, welche in Anwesenheit von 17 $\beta$ Östradiol miteinander interagieren. Da beide Proteine Gegenstand vorliegender Arbeit sind, wird darauf im Folgenden genauer eingegangen.

## 1.4 MCAD und seine Bedeutung im Energiestoffwechsel

Fettsäuren bilden für den menschlichen Organismus eine lebenswichtige Energiequelle. Der Metabolismus der Fettsäuren geschieht über den Zyklus der  $\beta$ -Fettsäureoxidation in den Mitochondrien der Zellen. Acyl-CoA Dehydrogenasen wie die Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (EC.1.3.99.3) sind mitochondriale Flavoenzyme, die den initialen Schritt der mitochondrialen Fettsäureoxidation katalysieren und somit den entscheidenden Schrittgeber in dem Prozess darstellen, der die Kohlenstoffketten der Fettsäuren in kleinere, verwertbare Metaboliten spaltet.<sup>48, 49</sup>

Von besonderer Bedeutung ist dies im Stoffwechsel des humanen Herzmuskels, der den Großteil des eigenen Energiebedarfs durch Fettsäureoxidation deckt.<sup>50</sup>

Als intramitochondrial aktives Enzym vermittelt MCAD den Abbau der mittelkettigen Fettsäuren in der Matrix der Mitochondrien. Entsprechend des hohen Energiebedarfs des Herzmuskels nehmen Mitochondrien in Kardiomyozyten mit bis zu 30% einen hohen Anteil am Zellvolumen ein (Abbildung 2).



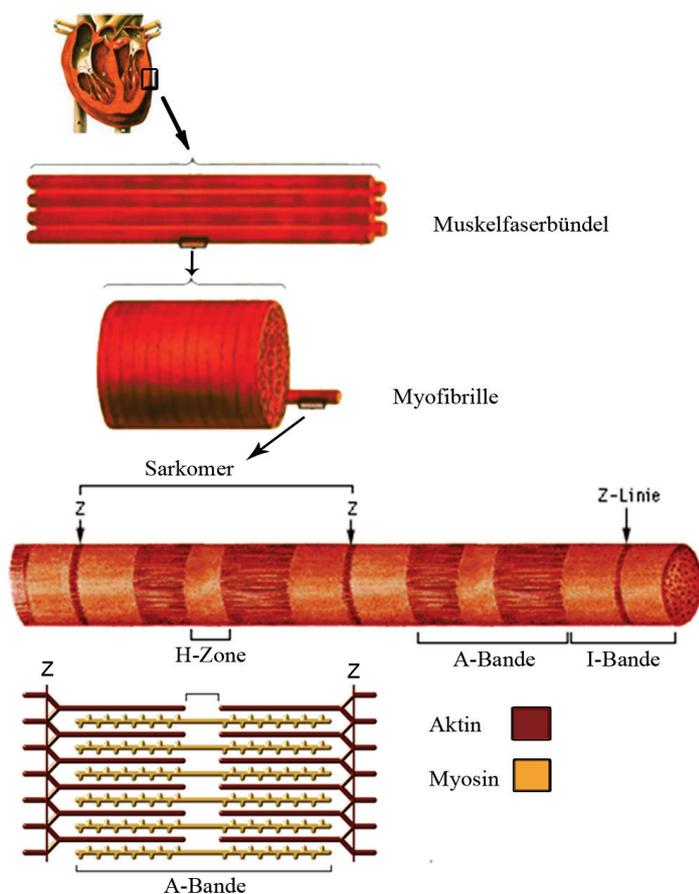
**Abbildung 2: Verteilung der Mitochondrien in Kardiomyozyten.** Elektronenmikroskopische Darstellung eines Kardiomyozyten mit großem Zellkern (Ncl, grau) und zahlreichen Mitochondrien (Mt, violett). Kontraktile Proteine wie Aktin und Myosin Myofilamente sind im Zytoplasma dargestellt. Sie bilden Banden von unterschiedlicher Dichte: A-Bande (A, orange), I-Bande (I, gelb), Z-Scheiben (Z, rot). Image Copyright mit freundlicher Genehmigung von Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Die Synthese des nukleär kodierten MCAD Proteins erfolgt als Vorläuferprotein, welches N-terminal mit einer 25 Aminosäuren langen Signalsequenz ausgestattet ist.<sup>51, 52, 53</sup> Unter proteolytischer Abspaltung des Signalproteins wird MCAD in die Mitochondrien importiert. Das so-

nannte reife Protein besitzt ein Molekulargewicht von 42,5 kDa. Die vier Untereinheiten des reifen Proteins bilden als Homotetramär mit einem FAD-Molekül das aktive Enzym.<sup>52</sup>

### 1.5 Das Muskelprotein Myosin Light Chain 4

Das menschliche Herz besteht aus einem funktionellen Verband von Muskelzellen, welche aus bündelweise angeordneten Myofibrillen aufgebaut sind. Diese bilden die kontraktile Bausteine des Muskels, deren kleinste Struktureinheit das Sarkomer darstellt (Abbildung 3).



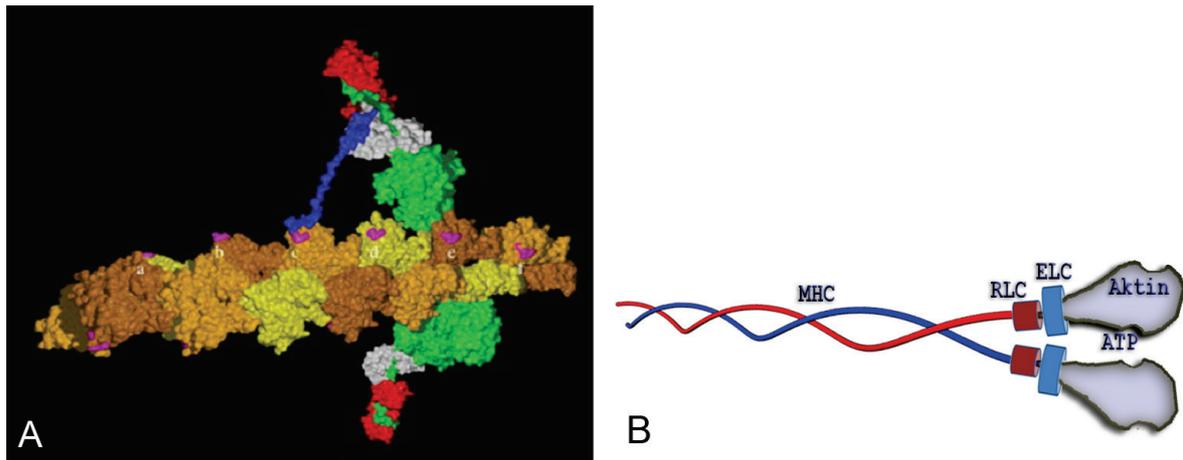
**Abbildung 3: Aufbau des Herzmuskels.** Muskelfasern setzen sich aus dicht gepackten Myofibrillen zusammen, welche wiederum aus Myosin- und Aktinfilamenten bestehen. Die Aktinfilamente erstrecken sich Sarkomerübergreifend bis in die A-Bande des benachbarten Sarkomers hinein, wohingegen die Myosinmoleküle auf die A-Bande eines Sarkomers begrenzt bleiben. Die A-Bande zeigt in ihrer Mitte eine Aufhellung, die H-Zone. Die Z-Scheiben begrenzen das Sarkomer als strukturelle Einheit und enthalten u.a.  $\alpha$  Aktinin. Modifiziert nach Rüdell und Brinkmeier.<sup>54</sup>

Myofibrillen bestehen aus parallel gelagerten dicken (Myosin-) und dünnen (Aktin-) Filamenten, denen Tropomyosin-Troponin Komplexe angelagert sind. Durch die regelmäßige Anordnung in Sarkomeren, die durch zwei Z-Streifen begrenzt werden, entsteht der Eindruck einer Querstreifung.

MYL4 ist Teil des Myosin Motorproteins II. Myosinmoleküle bestehen aus zwei schweren Peptidketten, die C-terminal einen  $\alpha$ -helikal verdrehten Schwanz formen. Am N-terminalen Ende bilden die Myosin-Schwerkette zwei längsovale Köpfe, die beide über eine Aktin- und ATP-Bindungsstelle verfügen.<sup>55</sup> Der Übergang des  $\alpha$ -helikalen Schwanzes zum Myosinköpfchen wird als ‚neck-region‘ bezeichnet und enthält die Myosin-Leichtketten, die (nicht phosphorylier-

bare) essentielle Leichtkette (ELC) und die (phosphorylierbare) regulatorische Leichtkette (RLC). Beide Myosin-Leichtketten stellen katalytische Domänen dar, die in verschiedenen Isoformen spezifisch in Skelettmuskulatur und Herzmuskel vorkommen (Abb. 4).

Myosin Light Chain 4 (MYL4, oder auch ALC1) bezeichnet die atriale Myosin-Leichtkette und stellt wie die ventrikuläre Myosin-Leichtkette (VLC1) eine Isoform der ELC dar, welche Herzspezifisch im menschlichen Herzen exprimiert wird.<sup>56</sup>



**Abbildung 4: Aktin-Myosin-Komplex (A)** 3-D-Modell der MYL4 im Aktin-Myosin Komplex. Das Köpfchen des Myosins ist grün markiert. MYL4 ist weiß, die RLC rot dargestellt. Aktin Einheiten sind in Orange, Braun und Gelb abgebildet. In Violett sind auf den Aktin-Einheiten die Interaktionsorte mit Myosin markiert. Blau sind die im Computer Modell erstellten 46 N-terminalen Aminosäuren der MYL4 mit der putativen Interaktion mit dem Aktin-Myosin-Komplex. **Myosinmolekül (B)** Schematisch dargestellt sind Myosin Schwerketten (MHC), die C-terminal einen  $\alpha$ -helikal gewundenen Schwanz und N-terminal die Myosinköpfe mit Bindungsstellen für Aktin und ATPase formen. In der Verbindungsstelle zwischen Köpfchen und Schwanz, der ‚neck-region‘, sind regulatorische (RLC) und essentielle (ELC) Myosin-Leichtketten assoziiert, wobei MLY4 die atriale Isoform der ELC darstellt. Modifiziert nach Aydt *et al.*<sup>57</sup>

Die Expression der MYL4 im menschlichen Herzen unterliegt einer entwicklungsbedingten Regulation. Im menschlichen Fötus wird MYL4 im gesamten Herzen wie auch im skelettalen Muskel exprimiert.<sup>58, 59</sup> Postnatal wird MYL4 im Ventrikel durch die ventrikuläre VLC1 ersetzt, wobei beide Isoformen der ELC durch verschiedene Gene kodiert werden.<sup>60</sup> Im adulten Herzen bleibt die Expression der MYL4 auf den atrialen Anteil des Myokards beschränkt.<sup>61</sup>

Unter erhöhter Belastung des Myokards kommt es im adulten Herzen zu einer Re-Expression der MYL4 außerhalb des Atriums.<sup>58</sup> So wurde MYL4 im Ventrikel von Patienten mit Hypertropher

obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM) nachgewiesen.<sup>62, 63</sup> Ebenso führte vermehrte Druckbelastung zu einer Expressionssteigerung der MYL4 im Ventrikel hypertensiver Herzen.<sup>64</sup> Dabei scheint der Grad der Genexpression der MYL4 mit dem Ausmaß der hypertrophen Stimuli auf das Myokard zu korrelieren.<sup>65</sup> Untersuchungen von Patienten mit valvulärer Aortenstenose konnten zeigen, dass die ventrikuläre Expression der MYL4 direkt von den im Ventrikel entwickelten systolischen und enddiastolischen Druckverhältnissen abhängig war. Wegfall des hypertrophen Stimulus nach operativer Normalisierung der hämodynamischen Verhältnisse führte zu einem Rückgang der MYL4 Expression.<sup>66</sup>

Als neuartige Interaktionspartner des ER $\alpha$  wurden MYL4 und MCAD in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek erstmalig identifiziert. Die Interaktion mit ER $\alpha$  sollte in weitergehenden Versuchen bestätigt und das Verständnis zur Bedeutung dieser Interaktion sollte in vorliegender Arbeit mit weiteren Untersuchungen vertieft werden.

## 1.6 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit ist eingebettet in ein Projekt, welches die Identifikation neuer Interaktionspartner des ER $\alpha$  im humanen Herzen zum Ziel hat. Hierbei wurden in einer humanen Herz cDNA Bibliothek mittels „Yeast-Two-Hybrid“ Assay unter anderem MYL4 und MCAD als potentielle Interaktionspartner von ER $\alpha$  identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war die Bestätigung von MYL4 und MCAD als neue Interaktionspartner des humanen ER $\alpha$  im „Yeast-Two-Hybrid“ System sowie die direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen und ER $\alpha$  nachzuweisen. Dazu wurden folgende Schritte verfolgt:

Zunächst sollte die 17 $\beta$ -Östradiol-abhängige Interaktion zwischen MYL4 bzw. MCAD und ER $\alpha$  durch 1:1 Retransformationsexperimente im „Yeast-Two-Hybrid“ System bestätigt werden. Anschließend sollten die an dieser Interaktion beteiligten Domänen des ER $\alpha$  identifiziert werden. Der interagierende Bereich der MYL4 sollte anhand N- und C-terminaler Proteinfragmente eingehender untersucht werden.

Im nächsten Schritt sollte die Interaktion von MCAD bzw. MYL4 mit dem ER $\alpha$  im humanen Myokardgewebe untersucht werden, um die Ergebnisse aus den „Yeast-Two-Hybrid“ Versuchen im menschlichen Herzen mittels Co-Immunopräzipitation bestätigen zu können.

Anschließend sollte die subzelluläre Lokalisation der Interaktion identifiziert werden. Dazu wurden durch Immunofluoreszenz-Studien Lokalisation und Co-Lokalisation von MCAD, MYL4 und ER $\alpha$  in humanem Myokardgewebe analysiert. Darüber hinaus sollte der Einfluss des 17 $\beta$ -

## Einleitung

---

Östradiol auf Lokalisation und Co-Lokalisation der identifizierten Interaktionspartner in einer humanen Kardiomyozytenzelllinie (AC16) analysiert werden.

Mit vorliegender Arbeit sollten durch Analyse der Interaktionen des ER $\alpha$  mit MCAD und MYL4 neue Erkenntnisse zu Bedeutung und Funktionsweise des Östrogenrezeptors im humanen Myokard erlangt werden.

## 2 Materialien

Im folgenden Kapitel sind die wesentlichen in dieser Arbeit verwendeten Materialien mit den entsprechenden Bezugsquellen aufgelistet.

### 2.1 Laborgeräte

**Tabelle 1: Laborgeräte**

Gerät	Bezeichnung	Firma
Autoklav	Systec V-150	Systec
Blottingapparatur		BioRad
Brutschrank	GFL 3033	GFL
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heracell 150	Heraeus
ELISA-Messgerät	Microplate spectrophotometer	BioRad
Entwicklungsmaschine	Curix60	Agfa
FastPrep Gerät	FP 120-230	ThermoSavant
Freezing Container	Nalgene Cryo1 Freezing Container	Nalgene Labware
Gelelektrophoresekammer		BioRad
Konfokal Mikroskop	Leica DM 2500	Leica
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss
Multilabel Counter	1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss
PCR-Gradienten Cyclus	Mastercycler Gradient	Eppendorf
Photometer	Genesys 6	Thermo Spectronic
Sterilbank	Holten Lamin Air	Jonan Nordic
Tischzentrifuge	Mikro 22 R	Hettich
Ultrazentrifuge	Optima Max Ultrazentrifuge	Beckmann
UV-Transluminator	Gel Imager	INTAS
UV-VIS-Spektrophotometer	Genesys 6	Thermo Spectronic
Vortexer	Reax 2000	Heidolph
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterial**

Material	Firma
3 mm Papier	Whatman
6-Loch-Zellkulturplatten	Biochrom

## Materialien

---

8-Kammer-Objektträger	BD Bioscience
Ceramic Sphere Kugeln	Qbiogene
Coverslips	Carl Roth GmbH
ECL	Amersham Biosciences
Entwickler	Kodak
Falcon-Polypropylen-Röhrchen	BD-Bioscience
Kryo-Röhrchen	Corning Incorporated
Lysis Matrix Kugeln	Qbiogene
Nitrocellulose-Membran	Amersham Biosciences
Parafilm	Sigma
Protein-G-Sepharosebeads	Amersham Biosciences
Reaktionsgefäße; 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Vectashield H-1000	Vector Laboratories
WB Film BioMax light	Kodak
Zentrifugenröhrchen; 15 ml, 50 ml	Biochrom
Zellkulturschalen und -Flaschen	TPP

---

## 2.3 Kits

**Tabelle 3: Molekularbiologische Kits**

Kit	Firma
pCR® 4-TOPO®TA Cloning Kit	Invitrogen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAPrep Spin Miniprep Kit,	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
ECL WB-Detection Reagents	Amersham Biosciences
Quick Ligation Kit	New England Biolabs
BCA Protein Assay	Pierce

---

## 2.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien haben den Reinheitsgrad “pro Analysis” und wurden, soweit nicht anders deklariert, von den Firmen Biozol Diagnostica GmbH (Eichingen), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Invitrogen (USA), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

## 2.5 Enzyme

**Tabelle 4: Enzyme**

Enzyme	Erkennungssequenz	Firma
Restriktionsendonukleasen		
BamHI	5'- G <sup>^</sup> GATCC -3' 3'- CCTAG <sup>^</sup> G -5'	Fermentas
EcoRI	5'- G <sup>^</sup> AATTC -3' 3'- CTTAA <sup>^</sup> G -5'	Fermentas
HindIII	5'- A <sup>^</sup> AGCTT -3' 3'- TTCGA <sup>^</sup> A -5'	New England Bio Labs
SacI	5'- GAGCT <sup>^</sup> C -3' 3'- C <sup>^</sup> TCGAG -5'	Fermentas
XhoI	5'- C <sup>^</sup> TCGAG -3' 3'- GAGCT <sup>^</sup> C -5'	Fermentas
DNase	Verdauen v. DNA	Invitrogen
SAP	Entfernen v. Phosphat-Resten	Roche
T4-Ligase [DNA-Ligase]	Verknüpfen v. DNA-Strängen	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase	Katalyse der DNA-Synthese	Invitrogen

## 2.6 Antikörper

**Tabelle 5: Primäre Antikörper**

Antikörper	Spezies	Firma	Anwendung
Anti-ER $\alpha$ -MC20	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz (# sc-542)	WB, IHC-P, ICC, IP
Anti-ER $\alpha$ -SRA1010	Maus monoklonal	StressGen (# SRA-1010)	WB, IHC-P, ICC, IP
Anti-MCAD	Maus polyklonal	Abnova (# 0034-B01)	IHC-P, ICC
Anti-MCAD	Ziege polyklonal	Santa Cruz (# sc-49046)	WB
MitoTracker		Molecular Probes CMX Ros M-7512	ICC
Anti-MYL4	Maus polyklonal	Abcam (# ab55462)	ICC
Anti-MYL4	Kaninchen polyklonal	AG Prof. Morano	WB, IHC-P, ICC, IP
Anti- $\alpha$ Aktinin	Maus monoklonal	Santa Cruz (#sc-166524)	IHC-P
DAPI	Kernfarbstoff	Sigma Aldrich	IHC-P, ICC

**Tabelle 6: Sekundäre Antikörper**

Antikörper	Markierung	Firma	Anwendung
Ziege anti-Kaninchen	FITC-Fluorochrom	Dianova	IHC-P, ICC
Ziege anti-Kaninchen	CY3-Fluorochrom	Dianova	IHC-P, ICC
Ziege anti-Maus	FITC-Fluorochrom	Dianova	IHC-P, ICC

## Materialien

Ziege anti-Maus	Cy3-Fluorochrom	Dianova	IHC-P, ICC
Ziege anti-Ratte	Cy3-Fluorochrom	Dianova	IHC-P, ICC
Ziege anti-Maus	HRP- Enzym	Promega	WB
Ziege anti-Kaninchen	HRP- Enzym	Dianova	WB
Esel anti-Ziege	HRP- Enzym	Dianova	WB

## 2.7 Kulturen und Medien

Für die Herstellung der Agarplatten wurden 20 g/l Agar zur entsprechenden Nährlösung zuge-  
setzt bzw. mit der entsprechenden Menge  $H_2O_{bidest}$  autoklaviert und nach Abkühlung auf  $55^\circ C$   
mit den restlichen Substanzen vermischt. Zur Unterdrückung der basalen Histidinsynthaseaktivi-  
tät in den Hefezellen wurde den –THULL/SD-Selektionsplatten 20 mM 3-Aminotriazol zugege-  
ben.

### 2.7.1 *E. coli* Stämme und Medien

**Tabelle 7: Bakterienstämme**

Stamm	Referenz
<i>E. coli</i> One Shot TOP10 (chemisch-kompetent)	Zur Amplifikation und Gefrierkultivierung von <i>prey</i> Plasmiden Genotyp: F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta$ ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> $\lambda$ - <i>rpsL</i> (StrR) <i>nupG</i> (Invitrogen)
<i>E. coli</i> XL1-Blue (chemisch-kompetent)	Zur Amplifikation von Vektoren Genotyp: <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rk-</i> , <i>mk+</i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [ <i>F'</i> ], <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>Tn10</i> (Tcr)] (Stratagene)

**Tabelle 8: Nährmedien für Bakterien**

Medium	Zusammensetzung
<b>Luria-Bertani-Medium</b> (steril)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 20 g/l Agar (nur für Platten) ad 1000 ml $H_2O_{bidest}$
<b>SOC-Medium</b> (pH 7, autoklaviert)	20 g/l Bacto-Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl

2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	Glucose (steril)
ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

## 2.7.2 Hefe-Stämme und Medien

**Tabelle 9: Hefestamm**

Hefestamm	Referenz
Saccharomyes cerevisiae L40 (S. cerevisiae L40)	Trägt die Reportergene HIS3 (kodiert für ein essentielles Protein der Histidin-Synthese) und lacZ (kodiert für $\beta$ -Galaktosidase) mit einem induzierbaren GAL1-Promotor, der an einen LexA-Bindungsstelle gekoppelt ist. Phänotyp: His-, Trp-, Leu-, Ade- Genotyp: MATa his3 $\Delta$ 200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2: (4lexAop-HIS3)URA3:(8lexAop-lacZ) GAL4 (Invitrogen)

**Tabelle 10: Medien und Zusätze für Hefen**

Medium/Substanz	Zusammensetzung	
<b>3-Aminotriazol</b>	1 M	steril filtrierte Stammlösung
<b>2x YPD-Stock (pH 6,5)</b>	80 g	Difco Pepton
	40 g	Hefeextrakt
	ad 950 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>YPD Medium</b>	500 ml	2x-YPD-Stock
	50 ml	40% Glucose
	100 $\mu$ g/l	Ampicillin
	12,5 $\mu$ g/l	Kanamycin
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>5x SD-Minimal-Medium</b>	33,5 g	Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>-THULL/-TL-Medium</b>	100 ml	10x -THULL/-TL-SD
	100 ml	10x SD-Stammlösung
	50 ml	40% Glucose
	20 ml / 80 ml	1 M Aminotriazol, steril filtriert
	1 ml	Ampicillin 100 $\mu$ g/ml
	1 ml	Tetracyclin 12,5 $\mu$ g/ml
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Z-Puffer (pH 7, autoklaviert)</b>	16,1 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	5,5 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O

## Materialien

	0,75 g/l	KCL
	0,246 g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	1 M	Thiamin-HCL
	20 mg/ml	X-gal
<b>Herring-sperm-carrier-DNA</b>	(10 mg/ml) Vor Gebrauch 20 min im Wasserbad gekocht.	
<b>PEG/ LiAc Lösung</b>	40%	PEG 4000 (steril)
	1x	TE Puffer (steril)
	1x	LiAc (steril)
<b>Z-Puffer/X-Gal Lösung</b>	100 ml	Z-Puffer
	0,27 ml	β-Mercaptoethanol
	1,67 ml	X-gal Stammlösung
<b>Stammlösungen</b>	10x LiAc-Lösung	1M Lithium Acetate (Sigma), pH auf 7.5 angleichen, steril
	10x TE Puffer	0,1M Tris HCL, 10mM EDTA, pH7.5, autoklaviert
	DMSO	(100%) Dimethylsulfoxide
	PEG 3350 (50%)	Polyethylene Glycol, mol.Gewicht = 3,350 (Sigma) mit sterilem H <sub>2</sub> O zubereitet
	X-gal Stammlösung	5-brom-4-chloro-3-indolyl-β-galctopyranoside (X-GAL) in N,N-dimethylformamide (DMF) bei einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst

Alle Lösungen wurden autoklaviert und hitzeempfindliche Zusätze steril zugesetzt.

**Tabelle 11: Antibiotika**

<b>Antibiotika:</b>	
Ampicillin (Na-Salz)	100 µg/ml
Tetracyclin (-Hydrochlorid)	12,5 µg/ml
Kanamycin (-Sulfat)	50 µg/ml

**Tabelle 12: Stammlösungen**

Aminosäuren	10x-THULL-SD [mg/l]	10x -TL-SD [mg/l]
L-Adenine hemisulfat salt	200	200
L-Arginin HCL	200	200
L-Histidin HCL	—	200
L-Isoleucin	300	300
L-Leucin	—	—
L-Lysin HCL	—	300
L-Methionin	200	200
L-Phenylalanin	500	500
L-Threonin	2000	2000
L-Tryptophan	—	—

L-Tyrosin	300	300
L-Valin	1500	1500
Uracil	—	200

### 2.7.3 Zelllinien und Medien

**Tabelle 13: Zelllinie**

Zelllinie	Relevanter Geno-oder Phänotyp
AC16	Proliferative humane Kardiomyozyten, die aus nicht-proliferierenden Primärkulturen von adulten linksventrikulären Herzgeweben erzeugt wurden. <sup>67</sup>

**Tabelle 14: Zusätze für Zellkultur**

Komponente	Firma
Amphotericin B (250 µg/ml in H <sub>2</sub> O bidest)	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Charcoal-stripped (c.s.) FKS	Biochrom AG
Dimeethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit und ohne Phenolrot	PAA Laboratories
L-Glutamin	PAA Laboratories
HEPES (1 M)	PAA Laboratories
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories
Penicillin/Streptomycin/Glutamin 100x (10.000 U/ml; 10 mg/ml; 29,2mg/ml)	PAA Laboratories
Trypsin/EDTA mit Phenolrot (0,25% Trypsin/1 mM EDTA)	GIBCO

**Tabelle 15: Medien für Zellkultur**

Zellen	Medium	Zusammensetzung
AC16	Vollmedium ± Phenolrot	12,5% (v/v) FKS
		1x Penicillin /Streptomycin
		0,1% (v/v) Amphotericin B
		DMEM/F12 (1:1) ± Phenolrot
AC16	Hungermedium	2,5% (v/v) c.s. FKS
		1x Penicillin /Streptomycin
		0,1% (v/v) Amphotericin B (Fungizone)
		DMEM/F12 (1:1)
	Kryomedium	Vollmedium + 5% (v/v) DMSO

## 2.8 Vektoren

**Tabelle 16: Klonierungsvektoren**

Vektor-Name	Relevante Charakteristika [Größe; Referenz]
pCR®4-TOPO	Linearer Klonierungsvektor [3956 bp; Invitrogen]
pCR®2.1	Klonierungsvektor, [3.9 kb; Invitrogen]
pACT2	Klonierungsvektor, [8.1kb; Clontech]
pACT2.2	Klonierungsvektor, [7.5 kb; Addgene Plasmid Repository]

Die aufgeführten Vektoren dienten entweder als Zwischenklonierungsvektoren oder wurden als Ausgangsmaterial für Umklonierungen verwendet.

**Tabelle 17: Rekombinante Zwischenklonierungsvektoren**

Vektor-Name	Relevante Charakteristika
Topo4-MCAD	Insert: Kloniert aus PCR-MCAD mit genspezifischen Primern mit BamHI - und XhoI- Schnittstellen
Topo4-MYL4	Insert: Kloniert aus pACT2-MYL4-humane cDNA mit genspezifischen Primern mit BamHI- und XhoI- Schnittstellen
Topo4- MYL4 AS 1-39	Insert: Kloniert aus pCR2.1-MYL4 AS 1-39 (freundliche Gabe Prof. Morano) mit EcoRI –Schnittstellen
Topo4- MYL4 AS 1-55	Insert: Kloniert aus pCR2.1-MYL4 AS 1-55 (freundliche Gabe Prof. Morano) mit EcoRI –Schnittstellen
Topo4- MYL4 AS 40-197	Insert: Kloniert aus pCR2.1-MYL4 AS 40-197 (freundliche Gabe Prof. Morano) mit EcoRI –Schnittstellen

Alle rekombinanten Vektoren wurden mit dem Vektor pCR4-TOPO hergestellt.

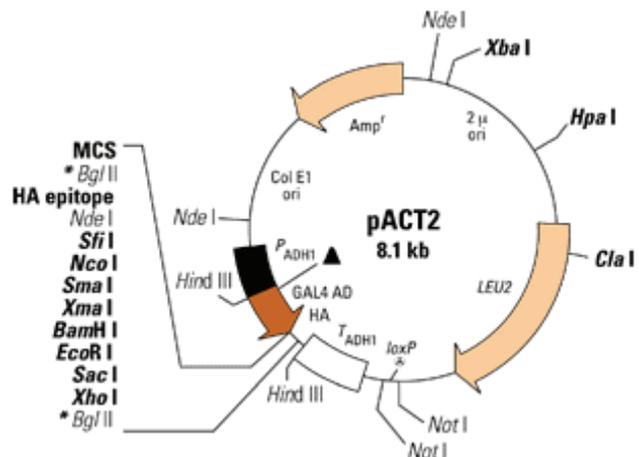
### 2.8.1 „Yeast Two Hybrid“ Vektoren

„Yeast-Two-Hybrid“-Vektoren besitzen einen bakteriellen Replikationsursprung (ori: origin of replication) und können sowohl in Hefen als auch in Bakterien autonom repliziert werden.

Tabelle 18: „Yeast Two Hybrid“ Vektoren

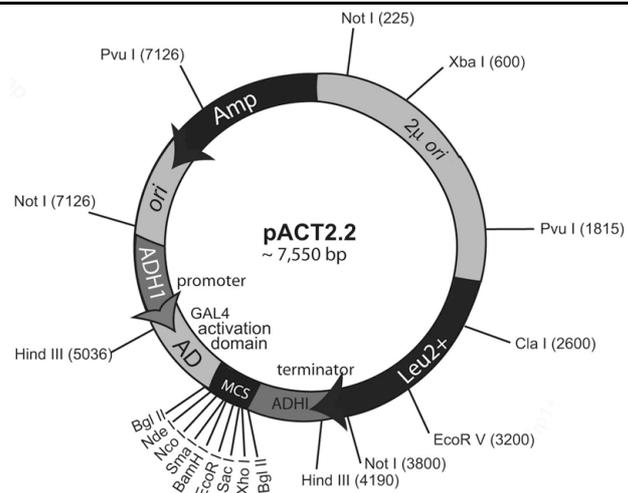
pACT2 (*prey*-Vektor)

Die Multiple Cloning Site (MCS) enthält eine GAL4- Aktivierungsdomäne (GAL4-AD; aa 768-881) zur Expression entsprechender Fusionsproteine und einen HA Epitope-tag. In der Hefe wird das Hybrid-Protein durch den konstitutiven ADH1 Promoter hoch exprimiert. Das Protein gelangt durch die Kernlokalisierungssequenz des SV40 T-Antigens in den Nukleus. pACT2 enthält zudem ein LEU2-Gen, welches den auxotrophen Hefen das Wachstum auf Leucin-negativen Selektionsmedien erlaubt. Auch Transformanden wie der Stamm E.coli Top 10 mit leuB Mutation können durch das LEU2-Gen selektiert werden.



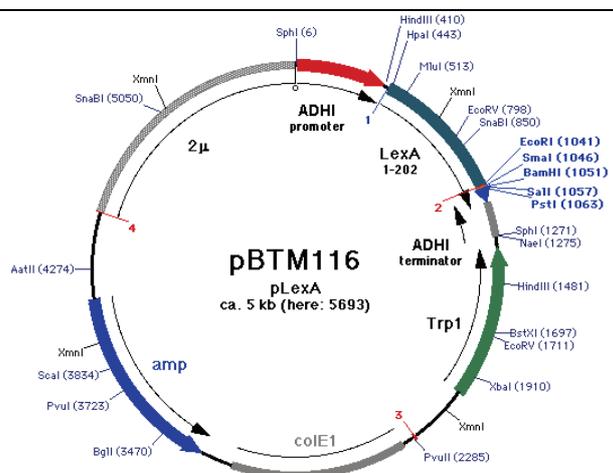
pACT2.2 (*prey*-Vektor)

Dieser entspricht in seinen Charakteristika dem pACT2 Vektor, besitzt die gleiche MCS, eine GAL4-AD, einen ADH1-Promoter und ein ADH1-Terminierungssignal. Nachdem der pACT2 Vektor nicht mehr zur Verfügung steht, wurde der pACT2.2 Vektor zur Expression der *prey*-Proteine eingesetzt.



pBTM116 (*bait*-Vektor)

Der *bait*-Vektor enthielt den humanen ER $\alpha$  und die ER $\alpha$  Domänen AD, EF in der BamHI/EcoRI- Schnittstelle der MCS 3' der LexA Bindungsdomäne. Er verfügt weiterhin über ein TRP1 Gen welches den auxotrophen Hefen das Wachstum auf Tryptophan-negativen Selektionsmedien erlaubt, sowie einen konstitutiven ADH1-Promoter und ein ADH1-Terminierungssignal (Bartel und Fields, 1995).



## 2.8.2 Plasmidkonstrukte

Rekombinante pBTM116 Vektoren sowie pACT2-MYL4 waren eine freundliche Gabe von H. Pham (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Regitz-Zagrosek). Alle weiteren rekombinanten pACT2 und pACT2.2 Vektoren wurden im Verlauf dieser Arbeit konstruiert.

**Tabelle 19: Rekombinante „Yeast Two Hybrid“ Vektoren**

Vektoren	Relevante Charakteristika
pACT2.2-MCAD	Insert: MCAD-cDNA, kloniert in die BamHI/EcoRI- Schnittstelle von pACT2.2
pACT2 -MYL4	Insert: MYL4-cDNA, kloniert in die BamHI/EcoRI - Schnittstelle von pACT2
pACT2.2-MYL4 <sup>AS 1-39</sup>	Insert: MYL4 N-terminale AS 1-39 -cDNA, kloniert in die EcoRI- Schnittstelle von pACT2.2
pACT2.2-MYL4 <sup>AS 1-55</sup>	Insert: MYL4 N-terminale AS 1-55 -cDNA, kloniert in die EcoRI- Schnittstelle von pACT2.2
pACT2.2-MYL4 <sup>AS 40-197</sup>	Insert: MYL4 C-terminale AS 40-197 -cDNA, kloniert in die EcoRI- Schnittstelle von pACT2.2
pBTM116-ER $\alpha$	Insert: ER $\alpha$ -cDNA, kloniert in die BamHI/EcoRI- Schnittstelle von pBTM116
pBTM116-ER $\alpha$ -AD	Insert: ER $\alpha$ -AD Domäne, kloniert in die BamHI/EcoRI-Schnittstelle von pBTM116
pBTM116-ER $\alpha$ -EF	Insert: ER $\alpha$ -EF Domäne, kloniert in die BamHI/EcoRI-Schnittstelle von pBTM116

## 2.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), sowie überprüfende Sequenzanalysen wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen. Die für die Primerkonstruktion benötigten Gensequenzen wurden der Gendatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) entnommen. Die optimale Primersequenz wurde mit Hilfe des Genamics ([www.genamics.com](http://www.genamics.com)) Programms erstellt. Die Spezifität der Primer wurde anschließend durch einen Abgleich mit dem *Local Alignment Search Tool* (BLAST; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) überprüft. Die Sequenzen und die richtige Orientierung im Zielvektor wurden nach der Längenüberprüfung per Gelelektrophorese durch Sequenzanalysen verifiziert.

### 2.9.1 Primer für die Synthese der MCAD-Expressionskonstrukte

Das Design der Primer wurde dementsprechend modifiziert, dass die Restriktionschnittstellen für die nachfolgenden Klonierungsschritte enthalten waren. Ein Teil dieser Primer wurde auch für Sequenzanalysen verwendet.

**Tabelle 20: Primer für PCR-Reaktion**

Primer	Nukleotidsequenz
MCAD-BamHI-FW	5'-TATAGGATCCATGGCAGCGGGGTT-3'
MCAD-XhoI-RV	5'-CGCTCTCGAGTTAATTTTTGTACTTGTC-3'
BamHI, XhoI: Restriktionsenzyme (Fermentas); FW: forward. RV: reverse	

### 2.9.2 Primer zur Sequenzanalyse der rekombinanten Plasmide

Die nachfolgenden Primer dienen der Verifizierung der Expressionskonstrukte und der rekombinanten Vektoren. Für die Bestätigung der Inserts in den pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup>-Vektoren wurden genspezifische Primer verwendet. Für die Identifizierung der *prey*-Inserts in den pACT2-Vektoren wurde der kommerziell erhältliche Standardprimer GAL4 AD eingesetzt. Für MCAD in pACT2.2 wurden folgende Primer generiert:

**Tabelle 21: Primer für die Sequenzierung**

Primer	Nukleotidsequenz
MCAD-Seq-FW	5'-TATAAGATGTGGATAACCAACGGA-3'
MCAD-Seq-RV	5'-TATATCCGTTGGTTATCCACATCT-3'

## 2.10 Probenmaterial und Patientengut

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Myokardproben entstammten nicht transplantierten Spenderherzen mit normaler systolischer Pumpfunktion (Kontrollgruppe) bzw. explantierten Herzen von Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie (DCM). Humane Atrium Proben wurden von 5 Patientinnen im Alter von 57-82 Jahren gewonnen, wobei das Durchschnittsalter bei 68 Jahren lag. Die Patientinnen wiesen eine hochgradige isolierte Aortenstenose mit kompensierter, konzentrischer Hypertrophie auf. Sämtliche Myokardproben wurden am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) gewonnen und freundlicherweise durch Prof. Hetzer zur Verfügung gestellt. Von allen Patienten wurde im Vorfeld eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie wurde im Rahmen eines vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums Charité genehmigten Protokolls in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

## 2.11 Software

**Tabelle 22: Software**

Software	Firma
BioEdit 7.0.9.0	Hall T 1999
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Endnote 9.0	Thomson
Genamics Expression 1.1	<a href="http://www.genamics.com">www.genamics.com</a>
Leica Application Suite 1.8.0	Leica
LSM Image Browser	Carl Zeiss
Microplate Manager 5.2	BIO-RAD
Microsoft Word	Microsoft
Motif Scan	<a href="http://www.scansite.mit.edu">www.scansite.mit.edu</a>
Photoshop CS3	Adobe Inc.

## 3 Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung und Konservierung von Hefen

Die Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden im entsprechenden Flüssigmedium im Schüttelinkubator bei 250 rpm und 30°C über Nacht kultiviert. Transformierte Hefe-Stämme wurden in selektivem Minimalmedium (SD-dropout) kultiviert, um den Selektionsdruck auf das Plasmid aufrecht zu erhalten. Arbeiten an den Kulturen wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zur Gefrierkonservierung wurden 500 µl einer Übernacht-Kultur mit 50% (v/v) Glycerol gemischt, in Kryoröhrchen überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Danach wurde die gefrorene Kultur bei -80°C gelagert.

#### 3.1.2 Kultivierung und Ernte von *E.coli* Bakterien

Die Anzucht der *E.coli*-Zellen erfolgte über Nacht bei 37°C in Luria Bertani (LB) – Flüssigmedium. Zur selektiven Vermehrung der plasmidtragenden Bakterien erfolgte die Kultivierung unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika. Plattenkulturen als Vorkultur wurden über Nacht im Brutschrank angezogen, während Flüssigkulturen im Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C pelletiert.

#### 3.1.3 Herstellung von Gefrierkulturen

Bakterien, die rekombinante Plasmide trugen, wurden zur Langzeitaufbewahrung gefrierkonserviert. Dazu wurde ein Bakterienklon über Nacht in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Die frische Kultur wurde am darauf folgenden Tag mit einem Vol. 50%igem (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend als Stammkultur bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.1.4 Transformation von Bakterien

Es wurden chemisch kompetente *E.coli* des Stammes Top 10 verwendet. Die chemische Transformation der Bakterien erfolgte entsprechend dem TOPO TA Cloning Kit Transformationsprotokoll. Dazu wurden 10-100 ng DNA des entsprechenden Vektors oder des Ligationsansatzes eingesetzt. Nach Auftauen der chemisch kompetenten *E.coli* auf Eis wurden 50 µl chemisch kompetenter Bakterien mit der zu transformierenden DNA vermischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Durch 30 sec Hitzeschock von 42°C im Wasserbad wird die Aufnahme der DNA in die Bakterien erleichtert. Der Transformationsansatz wurde erneut kurz auf Eis verbracht und

anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, in einen Falcontube überführt und für 2 h bei 37°C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde die Suspension auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht angezogen. Zur Überprüfung des Inserts wurde aus gewachsenen Kolonien DNA isoliert und nach dem Verdau mit Restriktionsendonukleasen sequenziert.

### **3.2 Zellkultur**

Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgten alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank. Die verwendeten Medien wurden mit Antibiotika und einem Antimykotikum versetzt. AC16 Zellen wurden in sterilen 6-Loch-Platten oder Kulturflaschen in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Für Immunohistochemische Experimente wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und Volumina so berechnet, dass die Zellen zu 10.000 in die Kammern von Chamberslides ausgesät werden konnten.

#### **3.2.1 Kultivierung von AC16 Zellen**

Die AC16 Zellen wurden in Vollmedium angezogen. Diesem wurde für die erfolgreiche Kultivierung Aktivkohle gefiltertes, fetales Kälberserum zugesetzt. Gegebenenfalls erfolgte die Zugabe von Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B. Die Anzucht erfolgte in sterilen Zellkultur-Flaschen oder 6-Loch-Platten. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und den Zellen mit einer Pipette frisches Medium zugeführt; je nach verwendeter Größe der Kulturflaschen/-schalen betrug das Volumen zwischen 2 ml und 10 ml. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

#### **3.2.2 Passagieren von AC16 Zellen**

Adhärenent wachsende AC16 Zellen wurden im Vollmedium kultiviert. Zellzahl, -Form und -Wachstum wurden dabei täglich unter dem Mikroskop beurteilt. Bei einer beobachteten Konfluenz von 90-100% wurden die AC16 Zellen im Verhältnis von 1:3 passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und der Flaschenboden zunächst mit 5 ml vorgewärmtem Trypsin/EDTA gewaschen, um restliches Medium und eventuell abgestorbene Zellen zu entfernen. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale erfolgte durch Zugabe von 3 ml 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung. Die Trypsinierung wurde im CO<sub>2</sub>-Inkubator durchgeführt. Nach 3-5 min wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 3 ml Vollmedium inhibiert. Die Zellsuspension

wurde anschließend in ein Falconröhrchen überführt, die Kulturflasche mit frischem Medium nachgespült und die gesamte Lösung bei 250 g für 5 min bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem, vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde entsprechend der weiteren Verwendung auf frische Kulturschalen oder Chamberslides verteilt.

### 3.2.3 Herstellung von Gefrierkulturen und Abtauen der AC16 Zellen

Zur Gefrierkonservierung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% in Vollmedium kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden wie beschrieben trypsiniert und pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem Kryomedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Kulturen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Rekultivierung der kryokonservierten Zellen wurde das Kryoröhrchen kurz bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad angetaut. Die Zellen wurden in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgelegtem Vollmedium überführt, bei 250 g für 5 min pelletiert, anschließend in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert, und in zwei Zellkulturschalen mit vorgelegtem Vollmedium überführt.

### 3.2.4 Stimulation von AC16 Zellen

Für die einzelnen Versuchsreihen wurden die Zellen in 6 Loch-Platten zu je 150.000 Zellen überführt. Nach einem Adaptionszeitraum von 24 h wurden die Zellen durch Zugabe von Hungermedium für weitere 24 h ausgehungert. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit  $10^{-8}$  M  $17\beta$ -Östradiol (E2). Als Kontroll-Ansatz diente Dextrin (Vehikel) in entsprechender Verdünnung, welches das zur Stimulation eingesetzte wasserlösliche E2 umhüllt.

Die Stimulanzen wurden in je 2 ml frischen Hungermedium zu ihrer jeweiligen Endkonzentration gelöst, auf die einzelnen Wells verteilt und für weitere 24 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Für eine 48 h andauernde Stimulation wurden die Zellen gegebenenfalls nach 24 h durch einen Mediumwechsel nachstimuliert.

### 3.2.5 Ernte der AC16 Zellen

Die Zellernte zur anschließenden Präparation von Gesamtprotein erfolgte am Ende des Versuches. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die adhärent gewachsenen Zellen durch wiederholte Zugabe von kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Loch 1 ml DMEM auf den 6-Loch-Platten verteilt und die Zellen mittels Zellschaber abgekratzt. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 17.500 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Absaugen entfernt und das Pellet für die nachfolgende Proteinisolierung auf Eis gelagert.

### **3.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Extraktion von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA Isolationen in kleinen Mengen wurden nach Protokoll des QIAprep Spin Miniprep Kits durchgeführt. Für Präparationen von größeren Mengen Plasmid-DNA wurden QIAGEN Plasmid Maxi Kits verwendet. Das erhaltene DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst.

#### **3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA**

Die Konzentration der DNA wurde in Quarzküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm mit einem UV-VIS-Spektralphotometer bestimmt. Die Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  pro ml Lösung. Der Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge ( $A_{260}/A_{280}$ ) wurde zur Qualitätsprüfung bestimmt und nur DNA-Präparationen mit ausreichender Reinheit wurden weiter verwendet.

#### **3.3.3 Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA in speziellen Elektrophoresekammern wurden 2%ige (w/v) Agarosegele eingesetzt. In einer Mikrowelle wird die Agarose in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, anschließend kurz abgekühlt, mit 5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in die Elektrophoresekammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6fachem Gel-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen verbracht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100-120 V für 50 min. Die aufgetrennten Moleküle erscheinen nach der Elektrophorese als Banden, die in einem UV-Transluminator photographiert wurden.

#### **3.3.4 Amplifikation von DNA**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase *in vitro*. Spezifisch für diese Reaktion generierte Primer hybridisieren an die flankierenden Sequenzen des 5'- und 3'- Stranges der Template cDNA (MCAD cDNA). Die PCR-Produkte wurden im Anschluss durch Sequenzierung überprüft.

**Tabelle 23: PCR-Ansatz**

Komponenten	Volumen	Optimierungsbereich
10x Buffer	2,5 µl	-
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	1,5 µl	1-3 mM
dNTP's [1,25 mM]	4 µl	-
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl	-
Glycerin [50%]	2,5 µl	-
FW-Primer [50 pmol]	0,2 µl	
RV-Primer [50 pmol]	0,2 µl	
Template	50 ng	50-200 ng
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 25 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

**Tabelle 24: PCR-Programm**

Schritt	Bedingungen	
1. Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 sec
3. Annealing	T <sub>m</sub> der Primer – 5 °C	30 sec
4. Elongation	72°C	1 min/kb
5. Wiederholung Schritt 2-4	30-35x	
6. Nachamplifikation	72°C	8 min
7. Abkühlen	4 °C	

### 3.3.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzbestimmung wurde durch Services in Molecular Biology (SMB, Berlin) durchgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme BioEdit und Genamics Expression sowie des BLAST-Programmes.

## 3.4 Methodenspektrum zur Klonierung

### 3.4.1 DNA-Restriktionsanalyse

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, bakteriellen Enzymen, die kurze, spezifische Sequenzen innerhalb von DNA-Doppelsträngen erkennen. An diesen Sequenzen kommt es durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen zur Spaltung des DNA-Doppelstranges. Dadurch werden einzelsträngige DNA-Fragmente mit kohäsiven (*sticky*) oder glatten (*blunt*) 3' oder 5' Enden erzeugt. Die in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöste DNA wurde

mit für die Restriktionsendonuklease spezifischem Puffer (vom Hersteller) versetzt. Für den Verdau von 1 µg DNA wurden 2 - 10 U Restriktionsenzym eingesetzt. Der Volumenanteil der Enzymlösung entsprach maximal 10% des Gesamtvolumens aufgrund des enthaltenen Glycerins, welches inhibierend auf die Enzymaktivität wirken kann. Die Restriktion erfolgte für 1,5 bis 3 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Um die Möglichkeit einer Re-Ligation zu limitieren, wurde enzymatisch gespaltene Vektor-DNA gegebenenfalls durch Zugabe von 10 U alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) bei 37° für eine Stunde dephosphoryliert. Im Anschluss wurde der Restriktionsansatz per Agarose-Gelelektrophorese analysiert und ggf. zur weiteren Verwendung aus dem Gel extrahiert.

### 3.4.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Zur Analyse von DNA-Fragmenten nach Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen oder zur Reinigung von DNA für eine PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse wurden die DNA-Fragmente der gewünschten Größe unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurden mittels QIAquick Gel Extraction Kit unter Verwendung des dazugehörigen Protokolls extrahiert.

### 3.4.3 Einfügen einer Restriktionsschnittstelle in eine DNA Sequenz

Für die Klonierung von Nukleotidsequenzen in einen Vektor werden passende Schnittstellen benötigt. Amplifiziert man die zu klonierenden Inserts durch eine PCR Reaktion, können durch entsprechendes Design der Primer (Kapitel 2.9.1) die passenden Schnittstellen eingefügt werden.

### 3.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

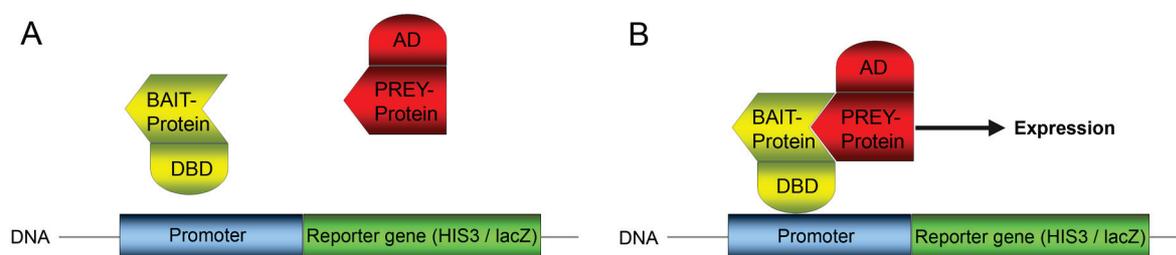
Geschnittene und gereinigte DNA-Fragmente (Inserts) wurden in die korrespondierenden Klonierungsvektoren mit Hilfe des Quick Ligation Kits eingefügt. Bei diesem Vorgang werden durch eine ATP-abhängige Ligase Phosphodiesterbrücken zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen geknüpft. Bei *sticky-end*-Ligationen wurde die zu klonierende DNA zunächst mit Restriktionsendonukleasen, die spezifische 5'- und 3'-überstehende Enden bilden, hydrolysiert. Anschließend erfolgte die Integration in den ebenfalls geschnittenen Vektor. Das Insert wurde in 3fachem molarem Überschuss gegenüber der Vektorkonzentration zugegeben. Die Ligation wurde mit 1 µl der Quick T4-DNA-Ligase und 10 µl eines 2x Quick-Ligation-Reaktionspuffers in einem Volumen von 21 µl für 5 min bei 23°C Raumtemperatur durchgeführt.

Die Ligationen in den linearen Übergangsvektor pCR4-TOPO mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits wurden entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden im Anschluss in chemisch kompetente *E.coli* transformiert.

### 3.5 Methodenspektrum für das „Yeast Two Hybrid“ System

#### 3.5.1 Prinzip des „Yeast-Two-Hybrid“ Systems

Das „Yeast-Two-Hybrid“ System dient der Identifikation von Proteininteraktionen *in vivo*. Es beruht auf der Rekonstruktion eines Transkriptionsfaktors, der sich aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) zur Bindung spezifischer DNA-Sequenzen und einer Aktivierungsdomäne (AD) zusammensetzt. In einem LexA/GAL4-basierenden „Yeast-Two-Hybrid“-Assay werden Hybrid-Proteine generiert (Abb. 5 A). Ein Hybrid besteht aus einem an die lexA-DBD fusionierten Protein, dem Köderprotein („bait“). Das zweite Hybrid wird mit der Gal4-AD fusioniert, und stellt den Beutejäger dar („prey“). Durch Interaktion von *bait* und *prey* werden DBD und AD in räumliche Nähe versetzt und ein funktioneller Transkriptionsfaktor gebildet (Abb. 5 B). Die Transkription der Reportergene Histidinsynthase und  $\beta$ -Galactosidase wird durch Wachstum auf auxotrophen Selektionsmedien (HIS3) oder Farbreaktion im  $\beta$ -Glaktosidase Assay (LacZ) nachgewiesen.



**Abbildung 5: Modell des Prinzips der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode.** **A** Das DBD-fusionierte *bait*-Protein bindet an die entsprechende DNA-Zielsequenz, kann aber, genau wie das AD-fusionierte *prey*-Protein die Transkription der Reportergene allein nicht aktivieren. **B** Durch die Interaktion zwischen *bait* und *prey* wird aus DBD und AD ein funktioneller Transkriptionsfaktor gebildet und die Reportergene können transkribiert werden. HIS3: Histidinsynthase; LacZ:  $\beta$ -Galaktosidase.

#### 3.5.2 1:1 Retransformation im „Yeast-Two-Hybrid“-System

Die 1:1 Retransformation dient der Bestätigung von Interaktionen, die durch Screening einer cDNA Bibliothek identifiziert wurden. Zudem können durch gezielte Retransformation beteiligte

Interaktionsdomänen identifiziert werden. Die Bestätigung der Interaktionspartner erfolgt durch Retransformation von *bait*- und *prey*-Protein in eine Hefezelle.

Als *bait* wurden ER $\alpha$ -full length (FL) Konstrukte und die einzelnen Domänen ER $\alpha$  A-D (AD) und ER $\alpha$  E-F (EF) enthaltenden Konstrukte verwendet. Die Herstellung dieser war in einer Vorarbeit der Forschergruppe unter Verwendung von humaner ER $\alpha$  cDNA erfolgt. ER $\alpha$ -FL wie auch die Domänen ER $\alpha$ -AD und ER $\alpha$ -EF wurden fusioniert an die *lexA*-DBD im Vektor pBMT116 im Hefestamm *S. cerevisiae* L40 exprimiert.

Zur Herstellung von *prey*-Fusionskonstrukten wurden MCAD cDNA bzw. MYL4 cDNA in *prey*-Vektoren kloniert und 1:1 in die mit *bait*-Fusionskonstrukten vortransformierte Hefe transformiert.

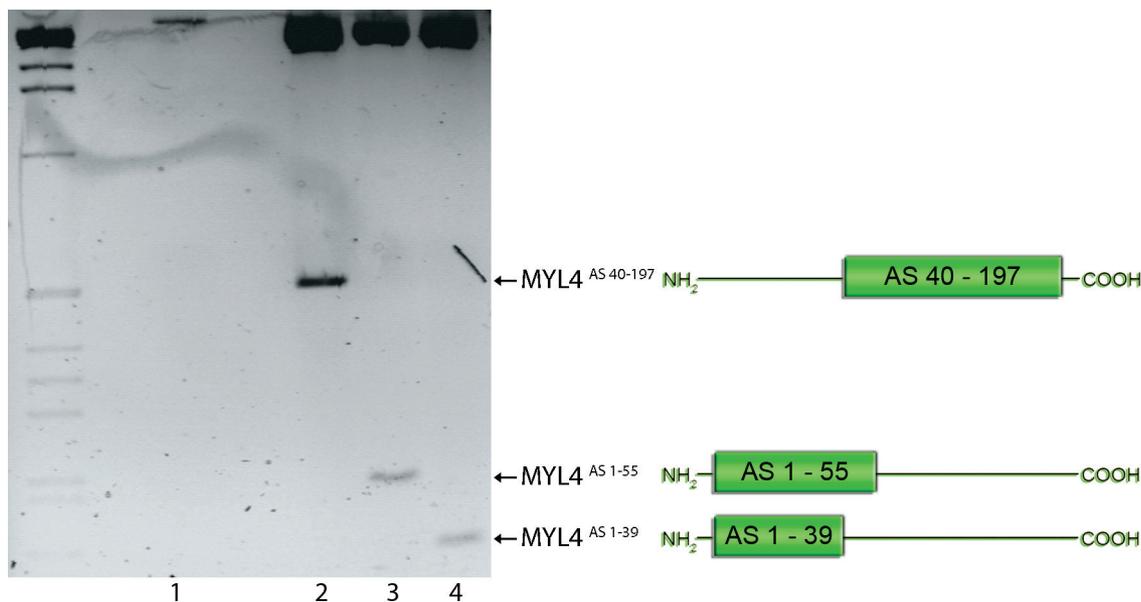
Zur Untersuchung der 17 $\beta$ -Östradiol-Abhängigkeit der Interaktion wurden die –THULL- Selektionsagarplatten mit 100 nM 17- $\beta$ -Östradiol oder mit dem Vehikel Ethanol in entsprechender Konzentration (0,001%) behandelt bzw. unbehandelt belassen.

### 3.5.3 Herstellung der MYL4 *prey*-Fusionskonstrukte

Zur Überprüfung des MYL4-*prey*-Fusionkonstruktes wurde Plasmid-DNA aus drei verschiedenen *E. coli* Kolonien (freundliche Überlassung durch Hang Pham) isoliert und die MYL4 cDNA aus dem Vektor pACT2 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Bam*HI herausgeschnitten. Die MYL4 Fragmente wurden aus dem Agarosegel extrahiert, sequenziert und die korrekte cDNA in allen 3 Kolonien verifiziert. Von diesen wurde eine zufällig ausgewählt, in einer  $\mu$ N Kultur angezogen, die Plasmid-DNA mittels Maxi-Prep isoliert und für die folgende 1:1 Retransformation eingesetzt.

Für die Herstellung der N- und C-terminalen MYL4 *prey*-Fusionskonstrukte wurde cDNA verwendet, welche für die N-terminalen Aminosäuren (AS) 1-39 bzw. AS 1-55 und die C-terminalen AS 40-197 des MYL4 Proteins kodierte. Diese wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Morano, MDC Berlin, zur Verfügung gestellt. Die cDNA war im Vektor pCR2.1 enthalten und wurde zunächst mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Eco*RI herausgeschnitten. Nach Überprüfung der Vollständigkeit der cDNA mittels Sequenzierung wurde diese in den Zwischenvektor pCR4-TOPO ligiert, anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Top10 transformiert und auf LB<sub>Amp</sub>-Platten kultiviert. Mehrere gewachsene Kolonien wurden erneut für die Überprüfung durch Sequenzierung angezogen. Die verifizierten MYL4<sup>AS1-39</sup>-, MYL4<sup>AS1-55</sup>-, MYL4<sup>AS40-197</sup>-Fragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI

aus dem pCR4-TOPO-Vektor geschnitten und den zuvor *EcoRI* restringierten *prey*-Vektor pACT2.2 ligiert (Abb. 6). Die richtige Orientierung der cDNA im *prey*-Vektor wurde durch gezielte Restriktionskontrolle überprüft und die korrekten rekombinanten *prey*-Vektoren mit MYL4<sup>AS1-39</sup>-, MYL4<sup>AS1-55</sup>-, MYL4<sup>AS40-197</sup>-Inserts wurden für die folgende Retransformation eingesetzt.



**Abbildung 6: Restriktionsanalyse der MYL4 Fragmente AS 1-39, AS 1-55 und AS 40-197.** In **Spur 1** wurde der geschnittene Vektor aufgetragen. **Spur 2:** MYL4<sup>AS 40-197</sup>, **Spur 3:** MYL4<sup>AS 1-55</sup>, **Spur 4** MYL4<sup>AS 1-39</sup>. Der Restriktionsverdau erfolgte mit *EcoRI* im Vektor pACT2.2.

#### 3.5.4 Herstellung der MCAD-*prey*-Fusionskonstrukte

Humane MCAD cDNA wurde im Vektor pACT2 mit Hilfe genspezifischer Primer (Kapitel 2.9.2) durch eine PCR Reaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* eingefügt wurden. Nach dem Schneiden der Produkte aus mehreren PCR-Ansätzen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden diese in einem Agarosegel analysiert und anschließend aus diesem extrahiert. Die cDNA wurde in den Zwischenvektor pCR4-TOPO ligiert, in chemisch kompetente *E. coli* Top10 transformiert und auf LB Amp-Platten kultiviert. Vier der gewachsenen Kolonien wurden für die Sequenzierung erneut angezogen. Aus den verifizierten Kolonien wurde einer zufällig ausgewählt und in den ebenfalls mit *BamHI* und *XhoI* restringierten *prey*-Vektor pACT2.2 ligiert (Kapitel 4.1.1; Abb. 9). Dieser wurde für die weiteren 1:1 Retransformationsexperimente eingesetzt.

### 3.5.5 Integration der *prey*-Fusionskonstrukte in die Hefe

Für die 1:1 Retransformation der einzelnen *prey*-Fusionskonstrukte wurde eine Einzelkolonie der *S. cerevisiae* L40 Hefe, die das zuvor transformierte ER $\alpha$ -*bait*-Fusionskonstrukt enthält, in 20 ml –T/SD-Medium (Selektion auf *bait*) resuspendiert und üN bei 30°C im Schüttelinkubator bis zur stationären Phase inkubiert. Am folgenden Tag wurde die üN Kultur mit YPD-Medium verdünnt und bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei RT für 5 min bei 3.000 g pelletiert. Das Pellet wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und in 1,5 ml 1x TE/LiAc resuspendiert. Zur Transformation der nun kompetenten Hefe wurden 50 µg Heringsperma-DNA als Träger-DNA für 20 min gekocht, anschließend auf Eis abgekühlt und mit 1 µg der *prey*-Fusionskonstrukte gemischt. Nach Zugabe von 50 µl kompetenter Hefe und 300 µl PEG/TE/LiAc wurde der Ansatz durchmischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von DMSO entsprechend einer 10%igen Endkonzentration im Gesamtansatz. Die DNA wurde durch Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 15 min in die Hefezellen transformiert. Die Hefe wurde in Folge für 2-3 min auf Eis verbracht, die Zellen für 1 min bei 17.500 g pelletiert und das Pellet anschließend in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Die Suspension wurde in 3facher-Ausführung auf 17 $\beta$ -Östradiol behandelten, der entsprechenden Menge Vehikel (Ethanol) oder unbehandelt belassenen –THULL/SD-Selektionsagarplatten ausplattiert. Diese waren zusätzlich mit 3-Aminotriazol versetzt, einem kompetitiven Inhibitor des Hefeeigenen HIS3 Proteins, der den unspezifischen Hintergrund auf den Selektionsplatten reduziert. Nach Inkubation bei 30°C zeigten sich nach 3-5 Tagen Kolonien, welche photographisch dokumentiert wurden. Ferner wurde durch erneutes Ausplattieren der gewachsenen Kolonien auf frische –THULL/SD-Selektionsplatten die Anzahl falsch-positiver Kolonien minimiert.

### 3.5.6 Überprüfung der *prey*-Vektoren auf Autoaktivität

Entsprechend des Transformationsprotokolls wurden die mit ER $\alpha$ -*bait*-transformierten Hefezellen mit den leeren *prey*-Vektoren pACT2 und pACT2.2 (Kapitel 2.8.1) co-transformiert. Die Co-Transformanden wurden anschließend zu je 200 µl auf –THULL/SD-Selektionsplatten ausplattiert. Diese waren nach oben beschriebenem Schema mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol oder Vehikel behandelt worden oder blieben unbehandelt. Nach drei Tagen Inkubation bei 30°C wurde bei fehlendem Klonwachstum auf den Selektionsplatten von keiner relevanten Autoaktivierung ausgegangen.

### 3.5.7 $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay beruht auf der Expression von  $\beta$ -Galaktosidase, dem zweiten Reportergen im „Yeast-Two-Hybrid“-System. Die exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase spaltet das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal) zu 5-Brom-4-Chlor-Indigo, was in blauer Farbgebung der  $\beta$ -Galaktosidase produzierenden Hefezellen resultiert.

Die Hefetransformanden wurden auf –TL/SD-Selektionsplatten ausplattiert. Für jede Platte wurde ein zugeschnittenes Whatman-Papier mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung überschichtet. Die Kolonien auf der –TL/SD-Selektionsplatte wurden auf ein trockenes Stück Whatman-Papier transferiert, indem das Whatman-Papier auf die Kolonien gelegt und mit anhaftenden Hefekolonien abgezogen wurde. Die transferierte Hefe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dadurch aufgebrochen. Anschließend wurden die Hefezellen auf das mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkte zweite Whatman-Papier verbracht und bei 30°C inkubiert. Nach ca. 1,5 h wurde der Versuch durch Trocknen des Filterpapiers gestoppt, die Färbung der Kolonien ausgewertet und photographisch dokumentiert.

## 3.6 Methoden der Proteinbiochemie

### 3.6.1 Extraktion von Proteinen aus humanen Herzproben

Für die Protein-Isolierung aus humanem Myokardgewebe wurden 50-60 mg Biopsiematerial eingesetzt. Das Zuschneiden und Abwiegen der Myokardproben erfolgte auf Trockeneis. Die Homogenisierung und der Zellaufschluss der Gewebeproben erfolgten mit frisch angesetztem Lysis-Puffer. Dem Ansatz wurden Lysis Matrix Kugeln und eine Ceramic Sphere Kugel zugesetzt und die Proben wurden in einem FastPrep Gerät auf Stufe 4 für 2x 20 sec homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit 10% konzentriertem SDS in Lysis Puffer versetzt, der Ansatz kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die lysierte Probe erneut gevortext. Anschließend wurde die Probe bei 17.500 g für 10 min zentrifugiert. Ein Aliquot des wässrigen Überstands wurde für die Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Der restliche Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und ggf. bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und mit dem BCA-Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte auf einer 96-well Platte mit Flachboden im ELISA-Messgerät. Für die Erstellung einer Albuminstandardkurve (0,1-2 mg/ml) wurde BSA verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 20  $\mu$ l Probe 1:2 und 1:10 verdünnt, bzw. die

Standardreihe mit 300 µl BCA Farbstoffgemisch versetzt. Als Referenz wurde der Lysis-Puffer mitgeführt. Die Konzentration der Proteine wurde im ELISA-Messgerät bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Anhand der Konzentration der Standardreihe konnte entsprechend der gemessenen Extinktion die Konzentration der Proben berechnet werden.

### 3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Fraktionierung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes. SDS ist ein anionisches Detergens, welches die Eigenladungen der Proteine überdeckt und eine gleichgerichtete Wanderung im Gel gewährleistet. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele bestehen aus einem Sammelgel, welches durch seine Porenweite der Konzentration der Proben dient, und dem eigentlichen Trenngel. Nach Reinigung der Glasplatten mit 70% (v/v) Ethanol wird die Gelkammer zusammengesetzt und mit dem flüssigen Trenngel befüllt. Der Gehalt an Polyacrylamid wurde dabei je nach Größe der zu analysierenden Proteine variiert (10-12%). Um eine glatte Gelkante zu erzielen, wird das Trenngel mit  $H_2O_{bidest}$  überschichtet. Dieses wird nach 45 min Polymerisation bei RT abgegossen und das Trenngel mit dem 5%igen Sammelgel überschichtet. Zur Ausbildung der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wird das fertige SDS-Gel in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Proben wurden mit Roti-Load Puffer versetzt, für 7 min bei 95 °C denaturiert und nach kurzer Zentrifugation zusammen mit einem Farbmaler im Gel aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 4°C, bis die Lauffront mit Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte.

### 3.6.4 Western Blot

Das Western Blot Verfahren dient der Fixierung und Immobilisierung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran. Zunächst werden Membran und Gel für 10 min in Transferpuffer äquilibriert, anschließend erfolgte die „sandwichartige“ Einbettung zwischen puffergetränktem Whatman-Papier und Schwämmen. Das „Sandwich“ wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Blottingapparatur eingesetzt. Das Blotten erfolgte für 1,5 h bei 4°C und einer Spannung von 100 V. Der erfolgreiche Transfer wurde anschließend durch Färbung mit Ponceau-Rot dokumentiert. Die Membran wurde hiernach entweder zur Immunodetektion eingesetzt oder auf Whatman-Papier getrocknet und gegebenenfalls bis zur weiteren Verwendung bei 4°C verwahrt.

### 3.6.5 Immunodetektion im Westernblot

Zum Blockieren einer unspezifischen Bindung des eingesetzten Antikörpers wird die geblottete Membran zunächst mit Blockierungspuffer überschichtet und für 1 h bei RT oder üN bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Der Puffer wird gegen einen Blockierungspuffer mit spezifischem Primärantikörper (Kapitel 2.6) ausgetauscht und üN bei 4°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung wird der Blot dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit dem in TBS-T verdünnten, sekundären Antikörper inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wird der Blot dreimal jeweils 10 min in TBS-T gewaschen. Die Sekundärantikörper sind spezie-spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche nach Zugabe der ECL-Detektionslösung selbige oxidiert und durch Anregung des ECL-Substrates eine Lichtemission auslöst. Die Blots wurden für 4 min mit ECL benetzt und der Blot nach Entfernung überschüssiger Lösung in handelsübliche Cellophan-Folie eingeschlagen. Zum Entwickeln wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm in eine lichtabschirmende Filmkassette gelegt. Der Film wurde für 5 sec bis zu 30 min exponiert und anschließend im Filmentwickler entwickelt.

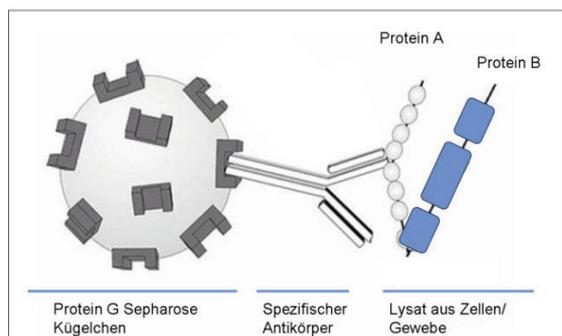
**Tabelle 25: Antikörper für die Immunodetektion**

Primär-AK	Verdünnung	Sekundär-AK	Verdünnung
Anti-ER $\alpha$ (MC-20)	1:500 in 5% Blockingpuffer	Esel-anti-Kaninchen	1:5.000
Anti-ER $\alpha$ (SRA1010)	1:500 in 5% Blockingpuffer	Esel-anti-Maus	1:5.000
Anti- MCAD	1:50 in 5% Blockingpuffer	Esel-anti-Ziege	1:10.000
Anti- MYL4 (Morano)	1.200 in 5% Blockingpuffer	Esel-anti-Kaninchen	1:10.000

## 3.7 Co-Immunopräzipitation

### 3.7.1 Prinzip der Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Mittels CoIP können Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Dazu wird Proteinlysat mit spezifischem Antikörper gegen einen der zu untersuchenden Interaktionspartner inkubiert. Nach Bindung des Zielproteins wird dieser mit Hilfe der Protein G Sepharose, welche spezifisch die Fc-Regionen der Immunglobuline bindet, präzipitiert. Dabei werden mit dem Zielprotein interagierende oder assoziierte Proteine co-präzipitiert (Abb. 7). Mehrere Waschschriffe entfernen unspezifisch gebundene Proteine. Durch Denaturierung werden Antikörpergebundene Proteine von der Sepharose gelöst und anschließend im Western Blot nachgewiesen.



**Abbildung 7: Funktionsprinzip der CoIP.** Ein Proteinlysate wird mit spezifischem Antikörper gegen Protein A inkubiert. Der an das Zielprotein gebundene Antikörper wird durch Protein G Sepharose-Kügelchen an eine stationäre Phase gebunden und durch Zentrifugation präzipitiert. Mit dem Zielprotein assoziiertes Protein B wird dabei co-präzipitiert und ist im Western Blot nachweisbar.

### 3.7.2 CoIP von ER $\alpha$ , MCAD und MYL4

Für CoIP Experimente in dieser Arbeit wurden Proteinlysate aus humanen Atriumbiopsien verwendet. Für einen Ansatz wurden jeweils 500  $\mu$ g Protein eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden 400  $\mu$ l der Protein-G-Sepharose beads mit dem gleichen Volumenanteil HNTG<sup>-</sup>-Puffer versetzt und für 5 min bei 4°C und 2.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang zweimal wiederholt. Das so gewaschene Sepharose-Pellet wurde in 400  $\mu$ l HNTG<sup>+</sup> Puffer aufgenommen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden 150  $\mu$ l des Sepharose Ansatzes mit 1% BSA in HNTG<sup>+</sup>-Puffer in einem Inkubationskarusell langsam drehend  $\bar{u}$ N bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte das „*preclearing*“ zur Entfernung unspezifischer Immunglobuline aus den Proteinlysaten. Dazu wurden Eppendorfgefäße mit jeweils 500  $\mu$ g Proteinlysate vorbereitet, denen je 50  $\mu$ l in HNTG<sup>-</sup>-Puffer gewaschener, unblockter Sepharose zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert wurde. Die Sepharose beads wurden abzentrifugiert, das gereinigte Lysat entnommen und auf frische Eppendorfgefäße aufgeteilt. Für die folgende Präzipitation wurden je nach Ansatz jeweils 1 bis 4  $\mu$ g eines spezifischen Antikörpers mit HNTG<sup>+</sup>-Puffer auf ein Volumen von 50  $\mu$ l pro Ansatz verdünnt und dem Lysat zugegeben. Eine Negativ-Kontrolle, der bei sonst gleicher Behandlung kein Antikörper zugegeben wurde, sowie eine Kontrolle für die Spezifität der Bindung mittels spezies-spezifischem Antikörper entsprechend des zur Immunopräzipitation verwendeten Antikörpers wurden mitgeführt. Alle Ansätze wurden  $\bar{u}$ N langsam drehend bei 4°C inkubiert, um die Ausbildung der Antikörper/Antigen Komplexe zu gewährleisten. Danach wurden die Ansätze mit jeweils 25  $\mu$ l der geblockten Protein G Sepharose versetzt, alles vorsichtig durchmischt und für weitere 2 h über

Kopf drehend bei 4°C inkubiert. Die Sepharose Kügelchen wurden anschließend bei 2.500 g 5 min bei 4°C abzentrifugiert und dreimalig mit HNTG<sup>+</sup>-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Präzipitat in je 21 µl HNTG<sup>+</sup>-Puffer resuspendiert, mit je 7 µl Protein-Ladepuffer versetzt und für 7 min bei 95°C denaturiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation vom Rest des Ansatzes getrennt und der Nachweis der co-präzipitierten Proteine erfolgte anschließend im Western Blot. Eine immunologisch detektierbare Bande des Zielproteins wurde dabei als positives Ergebnis gewertet. Zur Kontrolle der Antikörperbindung wurde zusätzlich unbehandeltes Lysat als Nativ-Ansatz mitgeführt.

### **3.8 Immunofluoreszenz**

#### **3.8.1 Immunohistochemie (IHC-P)**

Verwendet wurden atriale und linksventrikuläre, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte aus humanem Myokard. Zur Färbung müssen diese zunächst entparaffinisiert werden. Dies geschieht durch Eintauchen der Objektträger in Xylol (2mal je 10 min), in 100% Ethanol (2mal je 5 min), in 96%, 80% und 70% Ethanol für je 5 min und anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für 5 min. Es wurde darauf geachtet, die Schnittpräparate von diesem Zeitpunkt an nicht mehr austrocknen zu lassen. Die anschließende Demaskierung geschieht mit Hilfe von Zitronensäurepuffer. Dazu werden die Schnitte in Zitronensäurepuffer in der Mikrowelle gekocht und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend werden die Schnitte kurz in PBS-T abgespült. Zum Färben der Präparate werden diese zunächst in Blocking-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden für die Färbung die Primär-Antikörper (MCAD: 1:50; MYL4: 1:200 verdünnt in Blockingpuffer) dazu gegeben und die Gewebeschnitte bei 4 °C in einer selbst gebauten, feuchten Kammer üN inkubiert. Im Falle der Doppelfärbung wurde der zweite Primär-Antikörper für ER $\alpha$  (ER $\alpha$  SRA1010: 1:100; ER $\alpha$  MC-20: 1:10; alle verdünnt in 0,1% BSA in PBS-T) üN dazu gegeben. Am Folgetag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Schnitte wurden dreimal für je 10 min in PBS-T gewaschen. Alle weiteren Schritte folgten unter Abschirmung direkter Lichteinstrahlung. Die Schnitte wurden für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert (MCAD: FITC konjugierter Ziege-anti Maus Antikörper; MYL4: FITC konjugierter Ziege-anti Kaninchen; ER $\alpha$  SRA1010: Cy3 konjugierter Ziege-anti Maus; ER $\alpha$  MC20: Cy3 konjugierter Ziege-anti Kaninchen; alle 1:50 in 0,1% BSA/ PBS verdünnt). Anschließend erneutes Waschen der Schnitte. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (1:50.000). Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte getrocknet, mit Mounting Medium abgedeckt und das Deckgläschen mit Nagellack fi-

xiert. Die Schnitte wurden am Konfokal-Laser-Mikroskop analysiert oder bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

Kontrollfärbungen ohne Sekundärantikörper, ausschließlich mit Sekundärantikörper oder ohne Einsatz von Primär- oder Sekundärantikörper zeigen die Spezifität der Signalgebung durch die Primärantikörper. Für die Kontrollfärbungen wurden die Schnitte anstelle des jeweiligen Antikörpers mit Blockingpuffer inkubiert und anschließend wie alle anderen Färbungen weiterbehandelt.

### 3.8.2 Immunozytochemie (ICC)

Zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von ER $\alpha$ -, MCAD- und MYL4-Proteinen in AC16 Zellen wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern angefärbt (MCAD: 1:50; ER $\alpha$  MC-20: 1:10; MYL4: 1:20 und ER $\alpha$  SRA1010: 1:100; alle in 0,1% BSA/PBS verdünnt). Zunächst wurden die Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Kammer ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen für weitere 24 h mit 10 nM 17 $\beta$ -Östradiol oder Vehikel (Dextrin) in 300  $\mu$ l Hungermedium behandelt. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen mit PBS, die Fixierung mit 3% Formaldehyd/PBS und ein erneuter Waschgang. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 4 min mit 0,1% Triton X-100/PBS. Danach wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und für 30 min mit 1% BSA/PBS blockiert. Die Hybridisierung mit den primären Antikörpern gegen ER $\alpha$  bzw. MCAD und MYL4 erfolgte bei 4°C üN. Für Doppelfärbungen wurden die Antikörper gemeinsam zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit 0,1% BSA/PBS wurden die Zellen mit den Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert (MCAD: FITC konjugierter Ziege-anti Maus Antikörper; MYL4: FITC konjugierter Ziege-anti Kaninchen; ER $\alpha$  SRA1010: Cy3 konjugierter Ziege-anti Maus; ER $\alpha$  MC20: Cy3 konjugierter Ziege-anti Kaninchen; alle 1:100 in 0,1% BSA/PBS verdünnt) In den Negativkontrollen wurden die Zellen ohne primären sowie ohne primären und sekundären Antikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Dazu wurde in jede Kammer 200  $\mu$ l DAPI-Lösung gegeben und diese nach 3 min Einwirkzeit wieder entfernt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 0,1% BSA/PBS für jeweils 5 min gewaschen. Die Kammerwände wurden vom Objektträger entfernt, dieser wurde kurz luftgetrocknet und mit Mounting Medium auf einem Deckgläschen abgedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit Nagellack versiegelt.

Die Färbungen mit dem rot fluoreszierenden Mitochondrienfarbstoff MitoTracker erfolgten nach Herstellerprotokoll. Dabei wird der MitoTracker mit den Zellen in Kultur inkubiert. Die Doppel-

färbungen mit Antikörpern gegen ER $\alpha$  bzw. MCAD erfolgten nach Permeabilisierung der Zellen.

Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe des Leica-Konfokalmikroskopes. Die Co-Lokalisation der untersuchten Proteine kann durch die deckungsgleiche Darstellung (Overlay) der gemessenen Fluoreszenzemissionen der FITC-, Cy3- und DAPI-Kanäle dargestellt werden. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Leica Application Suite AF und dem LSM Image Browser.



## 4 Ergebnisse

Daten aus vorangegangenen „Yeast-Two-Hybrid“ Untersuchungen der Arbeitsgruppe weisen Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) sowie atriale Myosin Light Chain (MYL4) als putative Interaktionspartner des humanen ER $\alpha$  aus. In dieser Arbeit wurden die Interaktionspartner durch 1:1 Retransformationsexperimente im direkten „Yeast-Two-Hybrid“-Test und mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Assay verifiziert. Die in die Interaktion involvierten Domänen des Östrogenrezeptors wurden mittels „Yeast-Two-Hybrid“ Verfahren identifiziert. Darüber hinaus konnte die Interaktion des ER $\alpha$  mit beiden Interaktionspartnern mittels Co-IP im humanen Myokard bestätigt werden. Die Lokalisation und Co-Lokalisation der Interaktion von MCAD und MYL4 mit ER $\alpha$  im humanen Myokard wurde mittels Immunfluoreszenzverfahren dargestellt. Darüber hinaus wurde mit diesem Verfahren der Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol auf Lokalisation und Co-Lokalisation der identifizierten Interaktionspartner in der Kardiomyozytenzelllinie AC16 untersucht.

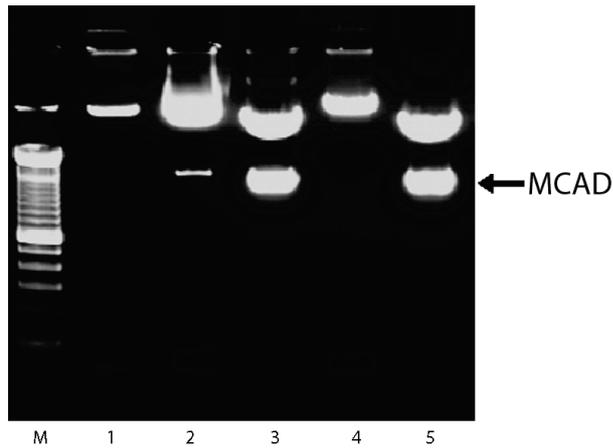
### 4.1 Bestätigung der putativen Interaktionspartner im „Yeast-Two-Hybrid“ System

Zur Bestätigung der Interaktion wurden 1:1 Retransformationsexperimente mit den einzelnen Interaktionspartnern durchgeführt. Dazu wurden humane ER $\alpha$ -cDNA als *bait*-Fusionskonstrukt und humane MCAD- bzw. MYL4-cDNA als *prey*-Fusionskonstrukte in die Hefezelle co-transformiert.

#### 4.1.1 Konstruktion der *Prey*-Fusionsvektoren

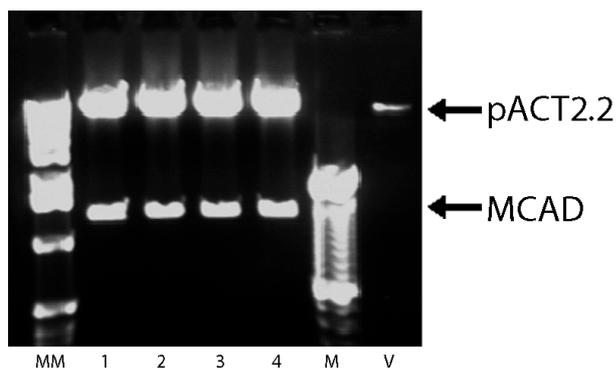
##### 4.1.1.1 *Prey*-Fusionskonstrukt MCAD

Für die Herstellung des MCAD *prey*-Fusionskonstruktes wurde zunächst die MCAD cDNA-Sequenz mittels genspezifischer Primer amplifiziert, anschließend in den Übergangsvektor pCR4-TOPO ligiert und in kompetente *E.coli* transformiert. Die selektierten Kolonien wurden anschließend mittels Restriktionsanalyse auf das richtige Insert untersucht. Der Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I zeigte nach Auftrennung im Agarosegel für die Klone 2, 3 und 5 die zu erwartende Fragmentgröße (1500 bp) (Abb. 8).



**Abbildung 8: Restriktionsanalyse der TOPO 4-MCAD Klone.** Restriktion der TOPO 4- MCAD Kolonien mit BamHI/XhoI. Spuren 1-5: einzelne Klone aus Ligation MCAD in TOPO-pCR4, die Banden 2, 3 und 5 zeigen die zu erwartende Größe von 1500 bp für Insert und 3900 bp für den Vector. M: 100 bp Standardlängenmarker.

Das Insert aus den Klonen mit dem richtigen Restriktionsmuster wurde vollständig sequenziert, um Punktmutationen auszuschließen. MCAD cDNA wurde aus Klonen mit der korrekten cDNA Sequenz isoliert und zur Herstellung des MCAD *prey*-Fusionskonstruktes in den Hefe Expressionsvektor pACT2.2 ligiert. Nach Amplifikation in *E.coli* erfolgte die Kontrolle der Klonierung mit erneutem Restriktionsverdau. Zwei Fragmente wurden anhand der Schnittstellen erwartet: 7550 bp für den Vektor und 1500 bp für das Insert (Abb. 9).



**Abbildung 9: Restriktionsanalyse der pACT2.2 MCAD Fusionskonstrukte.** Die Spuren 1-4 zeigen MCAD bei 1500 bp und den Vektor bei 7550 bp. Restriktionsverdau mit BamHI und XhoI. MM: 1 kb-Standardlängenmarker; M: 100 bp Standardlängenmarker; V: 100ng linearisierter Vector pACT2.2 als Referenz aufgetragen.

Nach Bestätigung der korrekten Nukleinsäuresequenz wurden die isolierten *prey*-Plasmide für die folgende Retransformation in Hefe eingesetzt.

#### 4.1.1.2 *Prey-Fusionskonstrukte MYL4*

Für die 1:1 Retransformationsversuche im „Yeast-Two-Hybrid“ wurden *prey*-Plasmide eingesetzt, welche die codierende MYL4 cDNA im Vektor pACT2 enthielten. Diese wurden analog zu den MCAD-Fusionskonstrukten mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf Korrektheit des Inserts überprüft und die isolierten *prey*-Plasmide mit der korrekten Sequenz zur Retransformation verwendet.

Für die 1:1 Retransformationsversuche im „Yeast-Two-Hybrid“ mit N-terminaler und C-terminaler MYL4 wurden uns N-terminale Fragmente mit den Aminosäuren (AS) 1-55 (MYL4<sup>AS 1-55</sup>) und AS 1-39 (MYL4<sup>AS 1-39</sup>) sowie das C-terminale, aus AS 40-197 bestehende Fragment (MYL4<sup>AS 40-197</sup>) freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Morano (MDC Berlin) überlassen. Für die Herstellung der *prey*-Fusionskonstrukte wurden diese in den Expressionvektor pACT2.2 umkloniert und nach Überprüfung der korrekten Sequenz und Ausrichtung im Vektor für die Retransformation eingesetzt.

#### 4.1.2 ER $\alpha$ interagiert mit MCAD und MYL4 im 1:1 „Yeast-Two-Hybrid“ Retransformationsversuch

Für die 1: 1 Retransformation wurde *S.cerevisiae* L40 verwendet. Die *prey*-Fusionskonstrukte MCAD und MYL4 wurden jeweils in bereits mit ER $\alpha$ -*bait* (ER $\alpha$ -FL, ER $\alpha$ -AD oder ER $\alpha$ -EF im Vektor pBTM116) transformierte Hefezellen co-transformiert. Die Hefezellen wurden anschließend auf Selektionsplatten (Selektion auf *bait*- und *prey*-Plasmide) ausplattiert, die entweder mit 17 $\beta$ -Östradiol in 10<sup>-8</sup> M Konzentration oder entsprechend mit Vehikel behandelt worden waren bzw. unbehandelt blieben.

Nach 2 Tagen Inkubation zeigten sich auf den 17 $\beta$ -Östradiol haltigen Selektionsmedien erste Kolonien, die nach 4 Tagen mit einem Durchmesser von 2-3 mm und rosafarbenem Aussehen eine Histidinsynthaseaktivität in den co-transformierten Hefezellen und somit die Interaktion zwischen *bait*- und *prey*-Fusionsvektoren nachwiesen.

##### 4.1.2.1 *ER $\alpha$ interagiert mit MCAD in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol in Hefe*

Mit ER $\alpha$ -*bait* und MCAD-*prey* co-transformierte Hefezellen wuchsen auf Selektionsmedium in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol (Abb. 10). Dies war nachweislich abhängig von der Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol (Abb.10 A), denn auf Vehikel behandelten (Abb. 10 B) und unbehandel-

ten –THULL-Selektionsmedien (Abb. 10 C) war kein Koloniewachstum beobachtbar. Diese Daten bestätigen, dass ER $\alpha$  und MCAD in der Hefe nur in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol miteinander interagieren.



**Abbildung 10: ER $\alpha$  interagiert mit MCAD im „Yeast-Two-Hybrid“-Versuch.** Koloniewachstum weist die Aktivierung des HIS3 Reportergens in Hefezellen nach, die MCAD als *prey*-Protein und ER $\alpha$  als *bait*-Protein exprimierten (A). Diese Aktivierung zeigte sich in allen Versuchen abhängig von der Behandlung des Selektionsmediums mit 17 $\beta$ -Östradiol. Kein Koloniewachstum war auf Vehikel behandelten (B) oder unbehandelten Selektionsmedien (C) beobachtbar. Die Versuche wurden zweifach wiederholt.

#### 4.1.2.2 *ER $\alpha$ interagiert mit MYL4 in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol in Hefe*

Entsprechend den oben vorgestellten Versuchen konnte die Interaktion des humanen ER $\alpha$  und MYL4 mittels 1:1 Retransformation bestätigt werden. Wie in Abbildung 11 gezeigt, war auch für diese Versuche eine Interaktion von ER $\alpha$ -*bait* mit MYL4-*prey* abhängig von der Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol (Abb. 11 A). In Abwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol war kein Koloniewachstum nachweisbar (Abb. 11 B).

Nach einer 4 tägigen Inkubationszeit wurden vereinzelt gewachsene Hefekolonien gepickt und auf frisches –THULL-Selektionsmedium übertragen. Der Retransfer auf frische Selektionsagarplatten reduziert die Möglichkeit des Wachstums falsch positiver Kolonien (Abb. 11 C). Im vorliegenden Versuch wurden diejenigen Kolonien, welche nach Retransfer ein gleichmäßiges Wachstum zeigten, als richtig bzw. positiv gewertet.



**Abbildung 11: Interaktion von ER $\alpha$  und MYL4.** (A) zeigt das Wachstum der Hefekolonien auf 17 $\beta$ -Östradiol-haltigem Selektionsmedium nach 4 Tagen Inkubation. (B) Vehikel behandelte oder unbehandelte Selektionsmedien zeigten kein Koloniewachstum und somit keine Interaktion. (C) Exemplarisch für die Interaktion von ER $\alpha$  mit MYL4 ist der Retransfer der gewachsenen Kolonien von A auf frische, 17 $\beta$ -Östradiol behandelte Selektionsagarplatten zum Ausschluss falsch positiver Kolonien dargestellt.

Diese Daten konnten MCAD und MYL4 als 17 $\beta$ -Östradiol abhängigen Interaktionspartner des humanen ER $\alpha$  im „Yeast- Two-Hybrid“ Assay bestätigen.

#### 4.1.3 Identifizierung der interagierenden Domänen des ER $\alpha$ mit MCAD und MYL4

Das humane ER $\alpha$ -Gen besteht aus mehreren funktionellen Domänen, denen charakteristische Funktionen zugeordnet sind. Aus diesem Grund sollten die beteiligten Domänen des Rezeptors, welche an der gezeigten Interaktion mit MCAD und MYL4 beteiligt sind, in einem nächsten Schritt identifiziert werden. Für diese Versuche wurden Hefezellen eingesetzt, welche ER $\alpha$ -bait-Konstrukte mit dem vollständigen Rezeptor (ER $\alpha$ -FL) bzw. die funktionellen Domänen des Östrogenrezeptors ER $\alpha$ -AD und ER $\alpha$ -EF exprimierten. Diese Hefezellen wurden nach dem beschriebenen Verfahren mit MCAD- bzw. MYL4-prey-Fusionskonstrukten co-transformiert. Alle Versuchsansätze wurden auf 17 $\beta$ -Östradiol-behandeltem, Vehikel-behandeltem und unbehandeltem Selektionsmedium ausplattiert.

Für die Co-Transformationsexperimente von ER $\alpha$  mit MCAD konnte die Interaktion in Anwesenheit des vollständigen ER $\alpha$ -FL beobachtet werden. Co-Transformationsversuche mit ER $\alpha$ -AD und ER $\alpha$ -EF zeigten keine Interaktion mit MCAD (Daten in Übersicht in Abb.14).

Für MYL4 konnte eine Interaktion mit ER $\alpha$ -FL als auch mit der EF-Domäne des ER $\alpha$  nachgewiesen werden (Abb. 12). Für Hefezellen, welche mit ER $\alpha$ -AD und MYL4 co-transformiert worden waren, war keine Aktivierung des HIS3 Reportergens nachweisbar.



**Abbildung 12: ER $\alpha$ -FL und ER $\alpha$ -EF interagieren mit MYL4.** Repräsentative Ausschnitte aus –THULL-Selektionsagarplatten. Das Wachstum der Hefekolonien zeigt die Interaktion des Co-transferierten ER $\alpha$ -FL (**A**) und ER $\alpha$ -EF (**C**) mit MYL4 durch Koloniewachstum auf 17 $\beta$ -Östradiol haltigem Selektionsmedium. Für ER $\alpha$ -AD (**B**) wurde keine Interaktion mit MYL4 beobachtet.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die C-terminale EF-Domäne des ER $\alpha$  wichtig für die Interaktion mit MYL4 ist. Für die Interaktion des Östrogenrezeptors mit MCAD war nur im Falle eines vollständig exprimierten Rezeptors ER $\alpha$ -FL eine Interaktion nachweisbar. Somit ließ sich mit vorliegenden Ergebnissen keine Eingrenzung auf Beteiligung einer bestimmten Interaktionsdomäne bei der Interaktion zwischen ER $\alpha$  und MCAD vornehmen. In allen Versuchsansätzen war die Interaktion abhängig von der Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol (Abb. 14).

#### 4.1.4 ER $\alpha$ interagiert mit dem N-terminalen Bereich der MYL4

Die Interaktion von ER $\alpha$  mit MYL4 in Hefe konnte durch Transformationsexperimente mit den einzelnen Domänen des ER $\alpha$  auf das C-terminale Ende des ER $\alpha$ -Rezeptorproteins eingegrenzt werden. Da keine bisher bekannten Motive Hinweise auf die beteiligte Domäne des MYL4-Proteins ergaben, sollte diese mittels Co-Transformationsversuchen mit den N- und C-terminalen Fragmenten der MYL4 näher analysiert werden.

Hefezellen, welche bereits die ER $\alpha$ -bait-Konstrukte ER $\alpha$ -FL sowie ER $\alpha$ -AD und ER $\alpha$ -EF exprimierten, wurden jeweils mit den N-terminalen MYL4<sup>AS 1-39</sup>, MYL4<sup>AS 1-55</sup> und der C-terminalen MYL4<sup>AS 40-197</sup> co-transformiert. Parallel dazu wurde die vollständige Sequenz MYL4<sup>AS 1-197</sup> (entsprechend MYL4), für welche in den vorhergehenden Versuchen die Interaktion mit ER $\alpha$ -FL und ER $\alpha$ -EF bereits bestätigt worden war, für alle Versuchsreihen als Kontrolle mitgeführt. Aus den bestehenden Kombinationsmöglichkeiten von ER $\alpha$ -Domänen mit MYL4 und den MYL4-Fragmenten ergaben sich jeweils 12 Ansätze, welche mit 17 $\beta$ -Östradiol stimuliert oder Vehikel-behandelt wurden bzw. unbehandelt blieben.

Die Ergebnisse der 12 Versuchsansätze zur Co-Transformation sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Dargestellt sind Ausschnitte aus –THULL-Selektionsagarplatten nach Behandlung mit 17 $\beta$ -Östradiol. MYL4<sup>AS 1-197</sup> zeigte, wie in unseren vorangegangenen Daten bereits dargestellt, die Interaktion mit dem vollständigen Rezeptorprotein ER $\alpha$ -FL sowie der C-terminalen Domäne ER $\alpha$ -EF in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol und diente als Kontrolle für die Retransformationsversuche von ER $\alpha$ -FL, ER $\alpha$ -AD und ER $\alpha$ -EF mit den einzelnen Fragmenten MYL4<sup>AS 1-39</sup>, MYL4<sup>AS 1-55</sup>, MYL4<sup>AS 40-197</sup>, während MYL4<sup>AS 1-197</sup> mit dem ER $\alpha$ -FL sowie ER $\alpha$ -EF interagiert. Für MYL4<sup>AS 1-55</sup> zeigten unsere Daten eine Interaktion mit ER $\alpha$ -FL. Für weitere Domänen des ER $\alpha$  konnte keine Interaktion mit MYL4<sup>AS 1-55</sup> beobachtet werden. Ebenso konnte keine Interaktion für N-terminale MYL4<sup>AS 1-39</sup> oder C-terminale MYL4<sup>AS 40-197</sup> mit dem vollständigen Östrogenrezeptor oder einzelnen Domänen nachgewiesen werden. Die Domäne ER $\alpha$ -AD zeigte in keinem der Versuchsansätze eine Interaktion mit MYL4<sup>AS 1-197</sup> oder einzelnen Fragmenten der MYL4. Alle Vehikel behandelten sowie unbehandelten Ansätze zeigten kein Koloniewachstum (Daten nicht gezeigt).

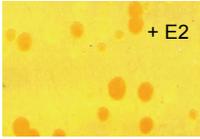
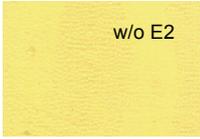
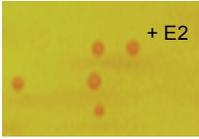
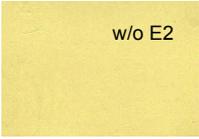
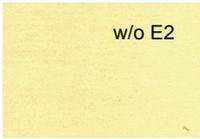
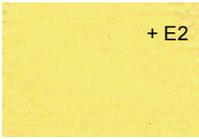
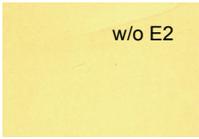
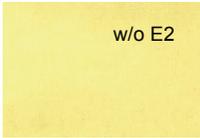
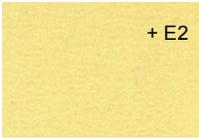
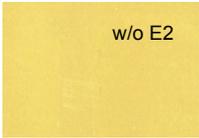
bait \ prey	MYL4			
	AS 1-197	AS 1-39	AS 1-55	AS 40-197
ER $\alpha$				
FL				
AD				
EF				

**Abbildung 13: Interaktion von ER $\alpha$  mit N-terminaler MYL4.** Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus –THULL-Selektionsagarplatten. Für MYL4<sup>AS 1-197</sup> wurde die Interaktion mit ER $\alpha$ -FL und ER $\alpha$ -EF in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol bestätigt. Für die MYL4-Fragmente war nur eine Interaktion zwischen N-terminaler MYL4<sup>AS 1-55</sup> und ER $\alpha$ -FL in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol nachweisbar.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass wahrscheinlich der N-terminale Bereich des MYL4-Proteins verantwortlich für die beobachtete 17 $\beta$ -Östradiol abhängige Interaktion von MYL4 mit dem ER $\alpha$ -Rezeptorprotein ist. Dabei scheinen die 39 N-terminalen Aminosäuren nicht für eine Interaktion ausreichend. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass der N-terminale Bereich der MYL4 inklusive der AS 40-50 bedeutend für die Interaktion ist.

Die Rezeptor-Domäne ER $\alpha$ -EF, welche im vorangegangenen Versuch mit MYL4 interagiert, zeigte in unseren Versuchen keine Interaktion mit dem einzelnen Fragment MYL4<sup>AS 1-55</sup>. Hierbei müssen beide Ergebnisse keine widersprüchliche Aussage treffen. Es ist möglich, dass eine Konformationsänderung der Proteinfragmente gegenüber den vollständig exprimierten Proteinen eine Assoziation von *bait* und *prey* und somit die Formation eines funktionellen Transkriptionsfaktors verhinderte. Daher kann eine Interaktion von ER $\alpha$ -EF mit MYL4<sup>AS 1-55</sup> nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend dargestellt konnten MYL4 und MCAD als Interaktionspartner des ER $\alpha$  im „Yeast-Two-Hybrid“ System in Abhängigkeit der Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol bestätigt werden (Abb. 14). Darüber hinaus konnte die Interaktion des ER $\alpha$  mit den N-terminalen MYL4<sup>AS 1-55</sup> gezeigt werden. Als an der Interaktion beteiligte Domäne des ER $\alpha$  konnte die C-terminale EF-Domäne des Rezeptors identifiziert werden. Eine Interaktion war in allen Versuchen ausschließlich in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol beobachtbar. Die ausbleibende Behandlung des Selektionsmediums oder die Behandlung mit Vehikel zeigte in keinem Falle ein Koloniewachstum und konnte die Östrogenabhängigkeit der Interaktion bestätigen.

prey	bait	ER $\alpha$ Full Length		ER $\alpha$ EF-Domain	
		+ E2	w/o E2	+ E2	w/o E2
MYL4					
MYL4 <sup>AS 1-55</sup>					
MCAD					

**Abbildung 14: Zusammenfassung der Interaktionen von ER $\alpha$  mit MYL4 bzw. MCAD und involvierten Domänen.** Dargestellt sind Ausschnitte aus –THULL-Selektionsmedien, welche mit 17 $\beta$ -Östradiol behandelt (+E2) oder Vehikel behandelt wurden (w/o E2). Koloniewachstum weist eine Interaktion zwischen ER $\alpha$ -FL mit vollständigem MYL4, N-terminaler MYL4 AS 1-55 und MCAD nach. Die C-terminale Domäne ER $\alpha$ -EF interagiert mit MYL4. Alle beobachteten Interaktionen waren abhängig von der Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol. MYL4: MYL4<sup>AS 1-197</sup>+E2: Behandlung mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol; w/o E2: mit Vehikel behandelt.

#### 4.1.5 Bestätigung der Interaktion von ER $\alpha$ im $\beta$ -Galaktosidase Assay

Im „Yeast-Two-Hybrid“-System ist mit dem für die  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden LacZ-Gen ein zweites Reportergen integriert, welches unabhängig von der Aktivierung des HIS3-Reportergens zum Nachweis einer Interaktion dienen kann.

Diejenigen Kolonien, welche durch die HIS3-Selektion auf –THULL Selektionsmedien MCAD und MYL4 als Interaktionspartner von ER $\alpha$  bestätigen konnten, sollten auf Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase untersucht werden. Die Aktivität dieses Enzyms zeigt sich in einer Blaufärbung der betreffenden Hefezellen und kann mittels  $\beta$ -Galaktosidase Assay nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Kolonien auf –TL-Selektionsmedien, die eine Selektion auf *bait*- und *prey*-Plasmide gewährleisten, transferiert. Diese wurden zur Demonstration der Östrogenwirkung mit