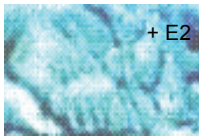
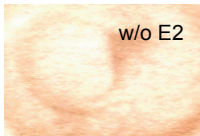
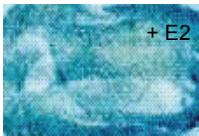
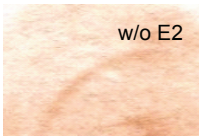
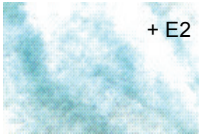
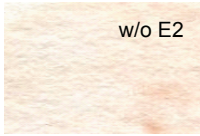
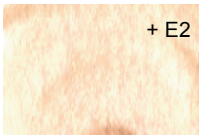
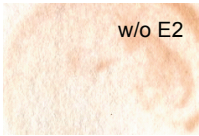
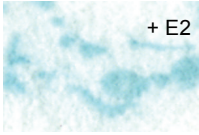
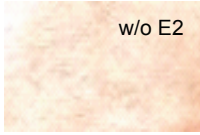

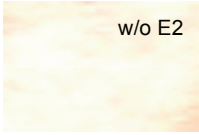


## Ergebnisse

17 $\beta$ -Östradiol oder Vehikel behandelt, bzw. unbehandelt belassen. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 15 dokumentiert.

Die Interaktion von ER $\alpha$  mit MCAD bzw. MYL4 konnte in Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase Assays bestätigt werden, wie der blaue Farbumschlag nachweist (Abb. 15). Die Interaktion von ER $\alpha$ -FL mit vollständiger MYL4 (MYL4<sup>AS 1-197</sup>) und N-terminaler MYL4<sup>AS 1-55</sup> sowie die Interaktion der ER $\alpha$ -EF Domäne mit MYL4 wurden ebenso bestätigt. Diejenigen Hefekolonien, welche Vehikel-behandelt oder unbehandelt auf den -TL-Selektionsmedien angezogen worden waren, zeigten im  $\beta$ -Galaktosidase Assay keinen Farbumschlag und somit ein negatives Ergebnis.

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

**Abbildung 15: Interaktionen von MYL4 und MCAD mit ER $\alpha$  im  $\beta$ -Galaktosidase Assay.** Dargestellt sind Ausschnitte aus den im Assay verwendeten Filterpapierstreifen. Dabei war entweder eine Behandlung mit 17 $\beta$ -Östradiol (+E2) oder mit Vehikel (w/o E2) erfolgt. Die erkennbare Blaufärbung bestätigt die Interaktion von ER $\alpha$ -FL mit MYL4<sup>AS 1-197</sup>, MYL4<sup>AS 1-55</sup> und MCAD sowie die Interaktion der ER $\alpha$ -EF Domäne mit MYL4<sup>AS 1-197</sup> in Abhängigkeit von 17 $\beta$ -Östradiol. Stellen sich die Hefezellen in rosiger Farbe dar, hat keine Interaktion stattgefunden. Alle beobachteten Interaktionen sind 17 $\beta$ -Östradiol abhängig. MYL4: MYL4<sup>AS 1-197</sup>; +E2: Behandlung mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol; w/o E2: mit Vehikel behandelt.

Die Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase Assay konnten die Interaktion von ER $\alpha$ -FL und MYL4 bzw. MCAD bestätigen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MYL4 über die EF Domäne mit ER $\alpha$  interagiert. Darüber hinaus bestätigten die Ergebnisse die Interaktion von N-terminaler MYL4<sup>AS1-55</sup> mit ER $\alpha$ -FL. Alle gezeigten Interaktionen waren abhängig von der Anwesenheit von 17 $\beta$ -Östradiol.

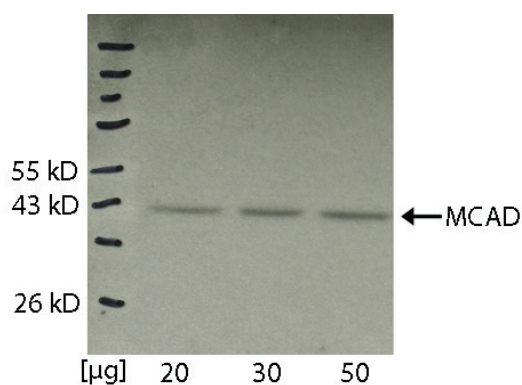
## 4.2 Die spezifische Interaktion von ER $\alpha$ mit MCAD und ER $\alpha$ mit MYL4 im humanen Herzen

Um zu untersuchen, ob die erhaltenen Ergebnisse aus „Yeast-Two-Hybrid“-Assays für die Interaktion von ER $\alpha$  mit MCAD bzw. MYL4 auf das humane Herzgewebe übertragbar sind, sollten eben diese Interaktionen im Folgenden im menschlichen Myokard untersucht werden.

### 4.2.1 MCAD, MYL4 und ER $\alpha$ werden im humanen Myokard exprimiert

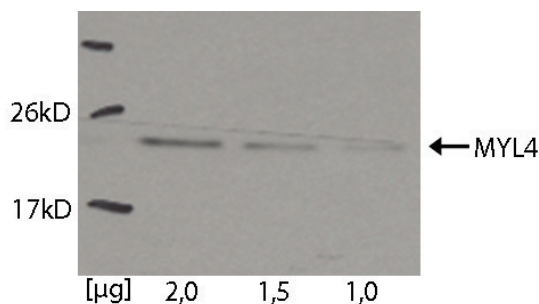
Zum Nachweis der endogenen Expression der interagierenden Proteine im menschlichen Herzen wurden Proteinlysate aus humanem atrialem und ventrikulärem Myokardgewebe mit spezifischen Antikörpern gegen MCAD, MYL4 und ER $\alpha$  mittels Western Blot analysiert (Abb.16-18).

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, ist das MCAD Protein mit der Größe von 42,5 kDa im humanen Atrium nachweisbar.



**Abbildung 16: Western Blot Analyse der MCAD Expression.** Proteinextrakt aus humanem Atrium wurde in aufsteigenden Mengen von 20  $\mu$ g, 30  $\mu$ g und 50  $\mu$ g eingesetzt. Mittels Antikörpers gegen MCAD (#sc-49046, Santa Cruz) wurde die spezifische Bande bei 42,5 kDa detektiert, was der zu erwartenden Größe des Proteins entspricht.

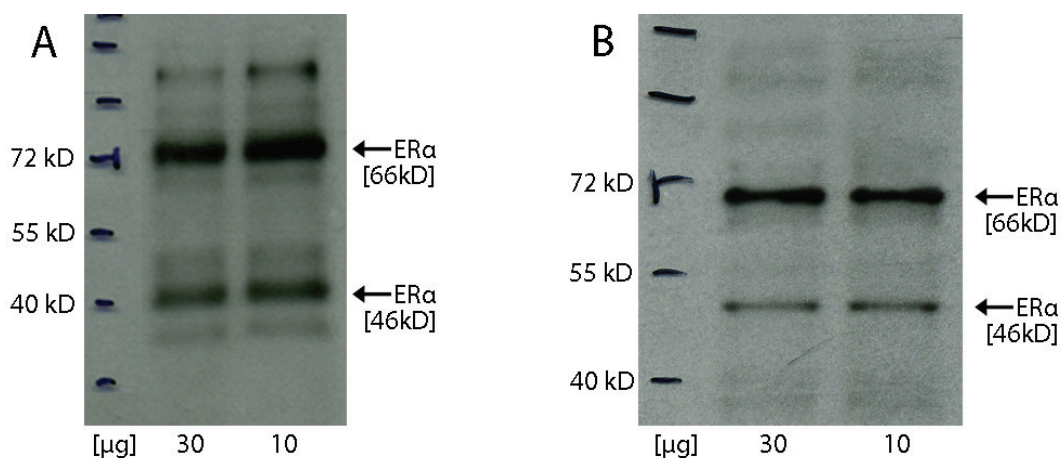
Die Western Blot Analysen in Gewebeproben aus humanem Atrium zeigten ebenfalls die Expression von MYL4 Protein im humanen Herzen. Wie der Abbildung 17 zu entnehmen, konnte MYL4 mit einer Größe von 21 kDa nachgewiesen werden.



**Abbildung 17: Western Blot Analyse der MYL4 Expression in humanem Atrium.** 1-2 µg Proteinextrakt wurden für den Nachweis des MYL4 Proteins eingesetzt. Nach Hybridisierung mit spezifischem Anti-MYL4 Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Morano, MDC Berlin) wurde bei 21 kDa eine repräsentative Bande detektiert, welche für das aus 197 Aminosäuren bestehende MYL4 Protein die zu erwartende Größe zeigt.

Zum Nachweis der Expression des ER $\alpha$  Proteins im humanen Myokard wurden zwei verschiedene Antikörper gegen ER $\alpha$  verwendet. Die Notwendigkeit zur Untersuchung der Proben mit beiden gegen ER $\alpha$  gerichteten Antikörpern war im Hinblick auf die geplanten Folgeversuche zur Immunopräzipitation mit den putativen Interaktionspartnern MYL4 und MCAD gegeben. Da die spezifischen Antikörper gegen MCAD und MYL4 verschiedenen Spezies entstammten (Anti-MCAD aus Maus und Anti-MYL4 aus Kaninchen), sollten ER $\alpha$  Antikörper aus jeweils divergierenden Spezies auf die Darstellung der spezifischen Banden des Rezeptors geprüft werden.

Beide Anti-ER $\alpha$  Antikörper (Anti-ER $\alpha$  SRA1010, Fa.StressGen, aus Spezies Maus und Anti-ER $\alpha$  MC-20, Fa.Santa Cruz, aus Kaninchen) detektieren ER $\alpha$  bei ca. 66 kDa und 46 kDa, welche zwei bekannte Isoformen des Rezeptors repräsentieren (Abb. 18 A und B).



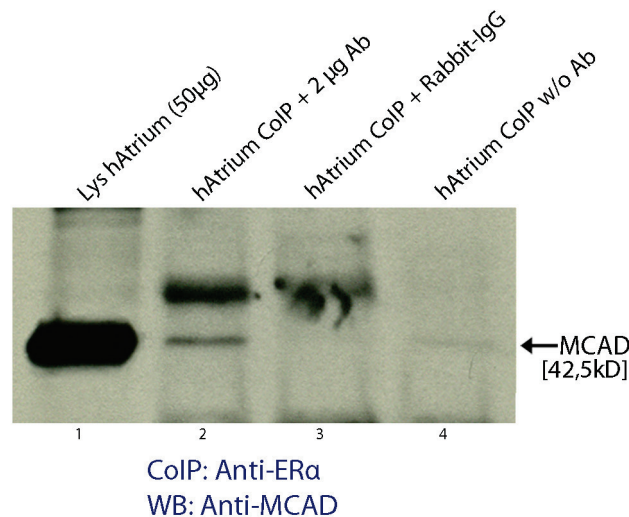
---

**Abbildung 18: Western Blot Analyse der ER $\alpha$  Expression im humanen Herzen.** 10 bzw. 30  $\mu$ g Proteinextrakt aus humanem Myokard wurden eingesetzt. **A** Resultat der Hybridisierung mit Anti-ER $\alpha$  SRA1010 (aus Maus) und **B** Anti-ER $\alpha$  MC-20 (aus Kaninchen). Die 46 kDa und 66 kDa Isoformen des ER $\alpha$  werden durch beide Antikörper erkannt.

Diese Ergebnisse konnten zeigen, dass die Interaktionspartner MCAD, MYL4 und ER $\alpha$  im humanen Herzen exprimiert und durch die verwendeten Antikörper spezifisch gebunden werden.

#### 4.2.2 MCAD und ER $\alpha$ interagieren im humanen Myokard

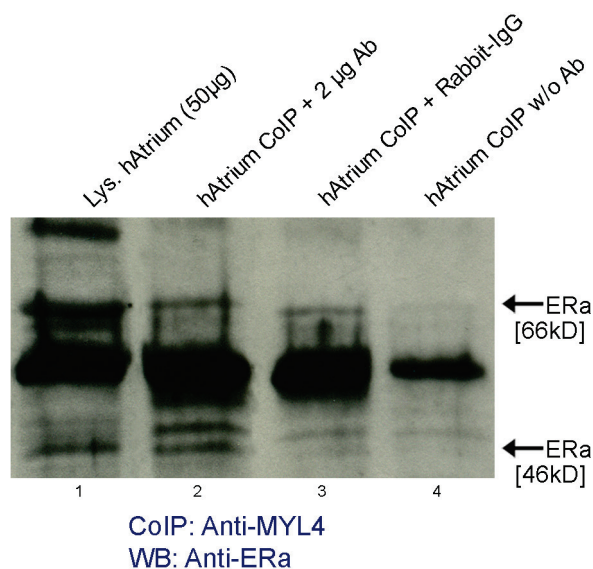
Um die Interaktion von ER $\alpha$  mit MCAD im humanen Herzen zu untersuchen, wurde eine Co-Immunopräzipitation (CoIP) mit Proteinlysate aus humanen Herzen durchgeführt. Ansätze von jeweils 500  $\mu$ g atrialem Gewebelysate wurden eingesetzt und die Proteine mit Anti-ER $\alpha$ -Sephrose beads immunopräzipitiert. Die anschließende Analyse des Präzipitates mit spezifischem Anti-MCAD Antikörper im Western Blot zeigte die Co-Präzipitation von MCAD (Abb. 19, Spur 2). Damit wurde gezeigt, dass ER $\alpha$  mit MCAD im humanen Herzen interagiert. Kontroll-Experimente, die ohne Antikörperzugabe (Abb.19, Spur 4) bzw. mit Zugabe von Spezies-spezifischem Immunglobulin (Abb. 19, Spur 3) durchgeführt wurden, zeigten keine Signale für MCAD im Western Blot. Diese Daten zeigen erstmalig, dass MCAD und ER $\alpha$  im menschlichen Herzen miteinander interagieren.



**Abbildung 19: ER $\alpha$  und MCAD interagieren im humanen Myokard.** Co-Immunopräzipitation (CoIP) mit anschließender Western Blot (WB) Analyse. Proteinextrakte aus humanem Atrium wurden mit Anti-ER $\alpha$ -MC-20 Antikörper präzipitiert. Co-präzipitiertes MCAD wurde durch Anti-MCAD Antikörper im WB detektiert. Spur 1: 50µg humanes Atriumlysate diente als Input. Spur 2 zeigt co-präzipitiertes MCAD. Spur 3: Kein Signal mit Kaninchen-IgG beweist die Spezifität des CoIP-Signals. Spur 4: Als weitere Negativkontrolle wurde die CoIP ohne Zugabe von Antikörper durchgeführt. Ab: Antikörper; IgG: Immunglobulin; Lys.: Lysat; w/o: ohne.

#### 4.2.3 MYL4 und ER $\alpha$ interagieren im humanen Myokard

Um die Interaktion zwischen MYL4 und ER $\alpha$  im Myokard untersuchen zu können, wurden CoIP Experimente an Biopsaten aus humanem atrialen Myokard durchgeführt. Nach Proteinextraktion aus atrialen Gewebeproben erfolgte die Immunopräzipitation mit Anti-MYL4-Sepharose beads. Eine Interaktion des präzipitierten MYL4 mit ER $\alpha$  wurde mittels spezifischem Anti-ER $\alpha$  Antikörper im Western Blot analysiert (Abb. 20, Spur 2). Die spezifischen Banden in Höhe von 66 kDa und 46 kDa repräsentieren den co-präzipitierten ER $\alpha$  und weisen damit die Assoziation beider Interaktionspartner im humanen Myokard nach. Als Positivkontrolle wurden 50 µg unbehandeltes Lysat aufgetragen, was der eingesetzten Proteinmenge (Input) entspricht (Abb. 20, Spur 1). Als Negativkontrolle wurden für die CoIP spezies-spezifisches Kaninchen-Immunglobulin (Abb. 20, Spur 3) und Ansätze ohne Antikörper (Abb. 20, Spur 4) eingesetzt, welche der Identifikation unspezifischer Bindungen des Anti-MYL4 Antikörpers dienen.



**Abbildung 20: MYL4 und ER $\alpha$  interagieren im humanen Atrium.** CoIP mit anschließender Western Blot (WB) Analyse. Proteinextrakte aus humanem Atrium wurden mit Anti-MYL4 Antikörper präzipitiert. Co-präzipitiertes ER $\alpha$ -Protein wurde durch Anti-ER $\alpha$  Antikörper im WB detektiert. Spur 1: Als Input dienten 50  $\mu$ g humanes Atriumlysate. Spur 2: Co-präzipitiertes ER $\alpha$  wird anhand der spezifischen Banden bei 66 kDa und 46 kDa detektiert. Spur 3: Als Negativkontrolle diente Kaninchen-IgG, wobei in geringem Umfang auch unspezifische Bindungen detektiert werden. Spur 4: Negativkontrolle ohne Antikörperzugabe. Ab: Antikörper; CoIP: Co-Immunopräzipitation; IgG: Immunglobulin; Lys.: Lysat; w/o: ohne.

Mit diesem Experiment konnte erstmals gezeigt werden, dass ER $\alpha$  und MYL4 im humanen Myokard miteinander interagieren.

### 4.3 Lokalisation und Co-Lokalisation von ER $\alpha$ und Interaktionspartnern MCAD und MYL4 im humanen Herzen

Nachdem die Interaktion von ER $\alpha$  mit MCAD und MYL4 in „Yeast-Two-Hybrid“-Versuchen und durch CoIP bestätigt werden konnte, sollten Immunfluoreszenzanalysen zu Lokalisation und Co-Lokalisation von ER $\alpha$ , MCAD und MYL4 weitere Erkenntnisse zur Interaktion im menschlichen Myokard liefern. Die Zuordnung zu bestimmten Zellkompartimenten könnte zudem Rückschlüsse auf molekulare Funktionsmechanismen der Interaktion erlauben.

#### 4.3.1 Immunfluoreszenzanalysen am humanen Myokard

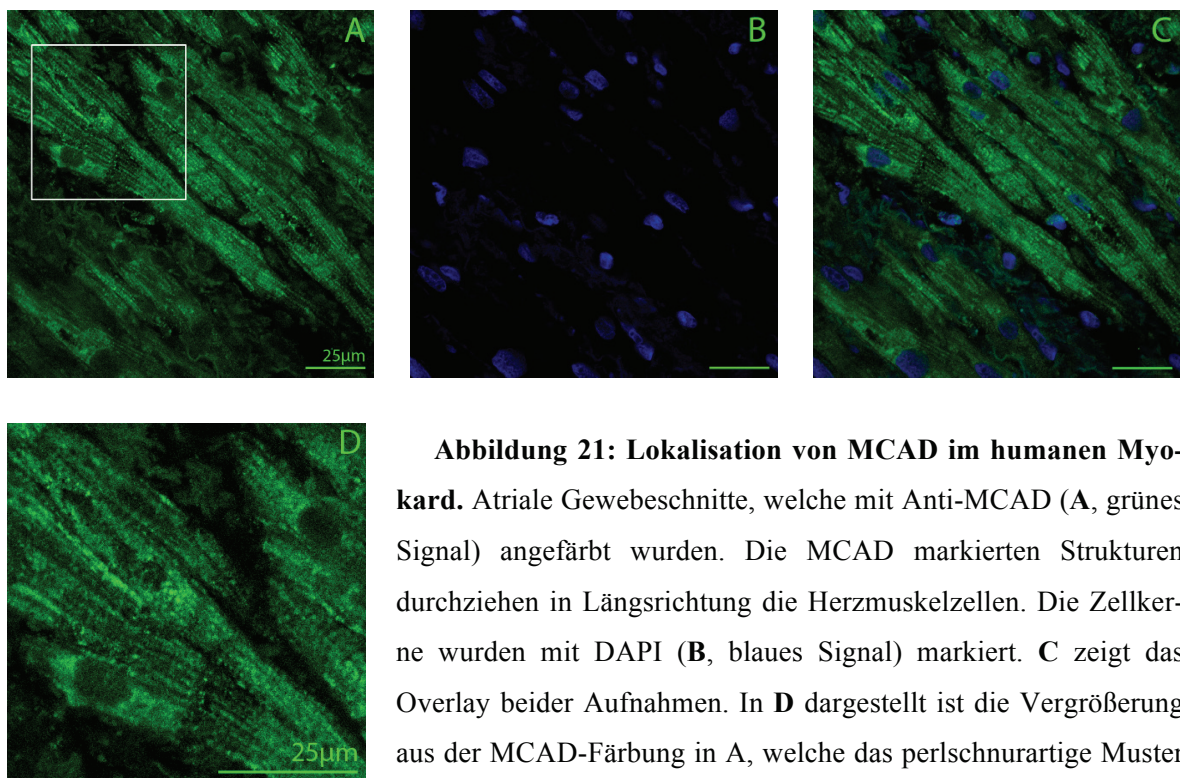
MCAD und MYL4 als Interaktionspartner von ER $\alpha$  sollten durch das Immunfluoreszenzverfahren im humanen Myokard lokalisiert und ihre Interaktion mit ER $\alpha$  mittels Co-Lokalisation dar-



gestellt werden. Biopsate aus Ventrikel und Atrium humaner Herzen wurden für die Analysen verwendet.

### 4.3.2 Lokalisation von MCAD im humanen Myokard

Zunächst wurde die endogene Lokalisation des MCAD Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers in Gewebeschnitten aus humanem Atrium und Ventrikel durch Immunofluoreszenzfärbungen mit anschließender Konfokalmikroskopie analysiert. Die Hybridisierung mit spezifischem Anti-MCAD Antikörper und anschließende Färbung mit Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper zeigt Strukturen von einem fädigen Muster, welche sich über die gesamte Länge der Myozyten ausbreiten (Abb. 21 A und D, grünes Signal). Dies entspricht dem zellulären Verteilungsmuster von Mitochondrien in Kardiomyozyten, die zwischen den einzelnen Myofibrillen angesiedelt sind und mehr als 30% des Zellvolumens einnehmen können (siehe Abb. 2). Zellkerne wurden anhand von DAPI-Färbungen sichtbar gemacht (Abb. 21 B, blaues Signal).

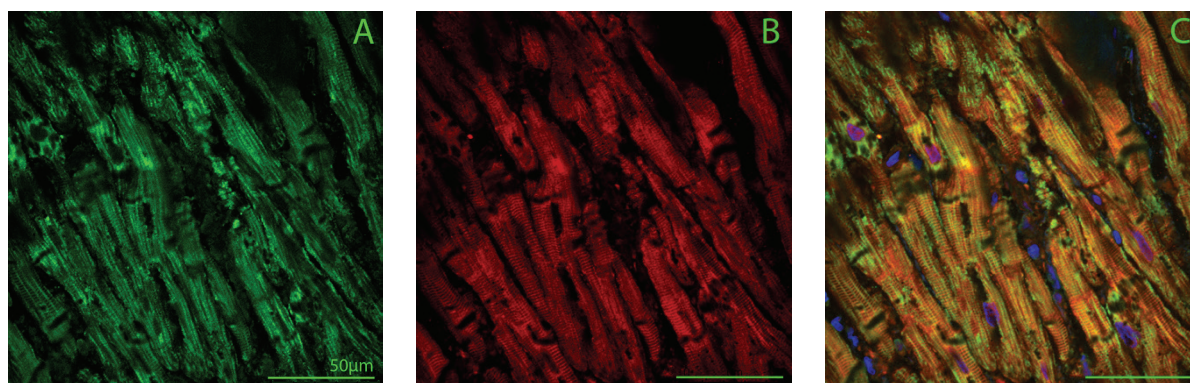


**Abbildung 21: Lokalisation von MCAD im humanen Myokard.** Atriale Gewebeschnitte, welche mit Anti-MCAD (A, grünes Signal) angefärbt wurden. Die MCAD markierten Strukturen durchziehen in Längsrichtung die Herzmuskelzellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (B, blaues Signal) markiert. C zeigt das Overlay beider Aufnahmen. In D dargestellt ist die Vergrößerung aus der MCAD-Färbung in A, welche das perlchnurartige Muster der MCAD Signale zeigt. Skalierungsbalken 25 µm.

### 4.3.3 Die Co-Lokalisation von ER $\alpha$ und MCAD im humanen Atrium

Um eine räumliche Assoziation von MCAD und ER $\alpha$  im humanen Myokard untersuchen zu können, wurden atriale Gewebeschnitte jeweils mit dem spezifischen Antikörper gegen MCAD und dem Antikörper gegen ER $\alpha$  angefärbt und mit Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper

behandelt. MCAD (Abb. 22 A, grünes Signal) zeigt die fädig elongierte Verteilung, welche einen Eindruck von Längsstreifung erzeugt, entsprechend des Verteilungsmusters für Mitochondrien zwischen den einzelnen Myofibrillen. Das Signal des ER $\alpha$  Antikörpers (Abb. 22 B, rotes Signal) ergibt ein quergestreiftes Muster. Bei Überlagerung beider Färbungen zeigt sich die Co-Lokalisation von MCAD und ER $\alpha$  (Abb. 22 C, gelbes Signal). Das Co-Lokalisationssignal entsteht im deckungsgleichen Bereich der markierten MCAD- und ER $\alpha$  Proteine, in dem grüne MCAD Signale und rote ER $\alpha$  Signale einander überlappend eine gelbe Farbgebung erzeugen. Diese Daten zeigen die Co-Lokalisation von ER $\alpha$  und MCAD im humanen Myokard. Das Co-Lokalisationssignal impliziert eine enge räumliche Assoziation beider Proteine und kann somit den indirekten Nachweis der Interaktion zwischen ER $\alpha$  und MCAD im Bereich der Mitochondrien liefern.



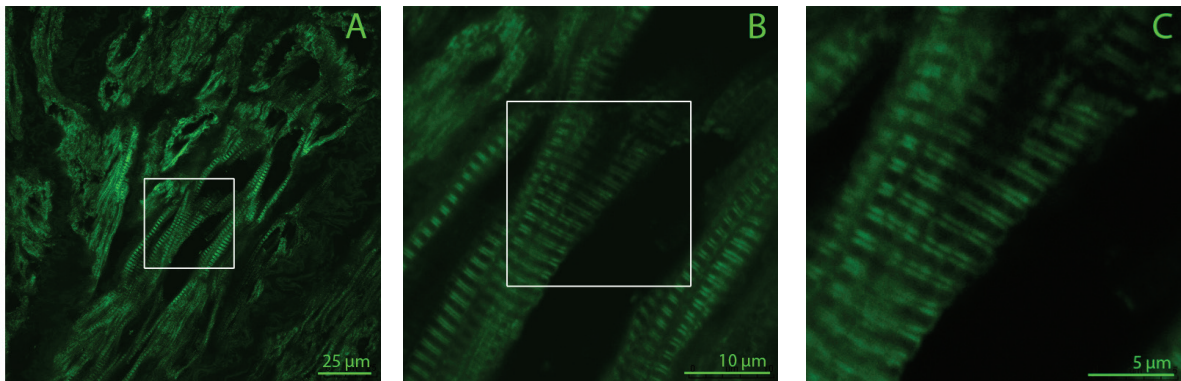
**Abbildung 22: MCAD und ER $\alpha$  interagieren im humanen Myokard.** Atriale Gewebeschnitte. Die Markierung mit MCAD (A, grünes Signal) zeigt Signale im charakteristischen fädig-elongiertem Muster. ER $\alpha$  (B, rotes Signal) konnte am Sarkolemm, im Zytoplasma und den Glanzstreifen des Myokards lokalisiert werden. Die Überlagerung beider Aufnahmen (C, gelbes Signal) zeigt die Co-Lokalisation von MCAD und ER $\alpha$  im humanen Herzen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaues Signal) markiert. Skalierungsbalken 50  $\mu$ m.

#### 4.3.4 Lokalisation von MYL4 in humanem Atrium

In humanen Atriumschnitten resultierte die Markierung mit Anti-MYL4 Antikörper und Fluoreszenz-gekoppeltem Sekundärantikörper in einer Signalgebung von gleichmäßigem Muster, welches die untersuchten Gewebeschnitte durchzieht (Abb. 23 A-C, grünes Signal). Es zeigt sich ein Streifenmuster, welches aus regelmäßig angeordneten Doppelbänden besteht (Abb. 23, B 4fache- und C 8fache Vergrößerung). Die einzelnen Doppelbänder erreichen eine Breite von 1,2  $\mu$ m und

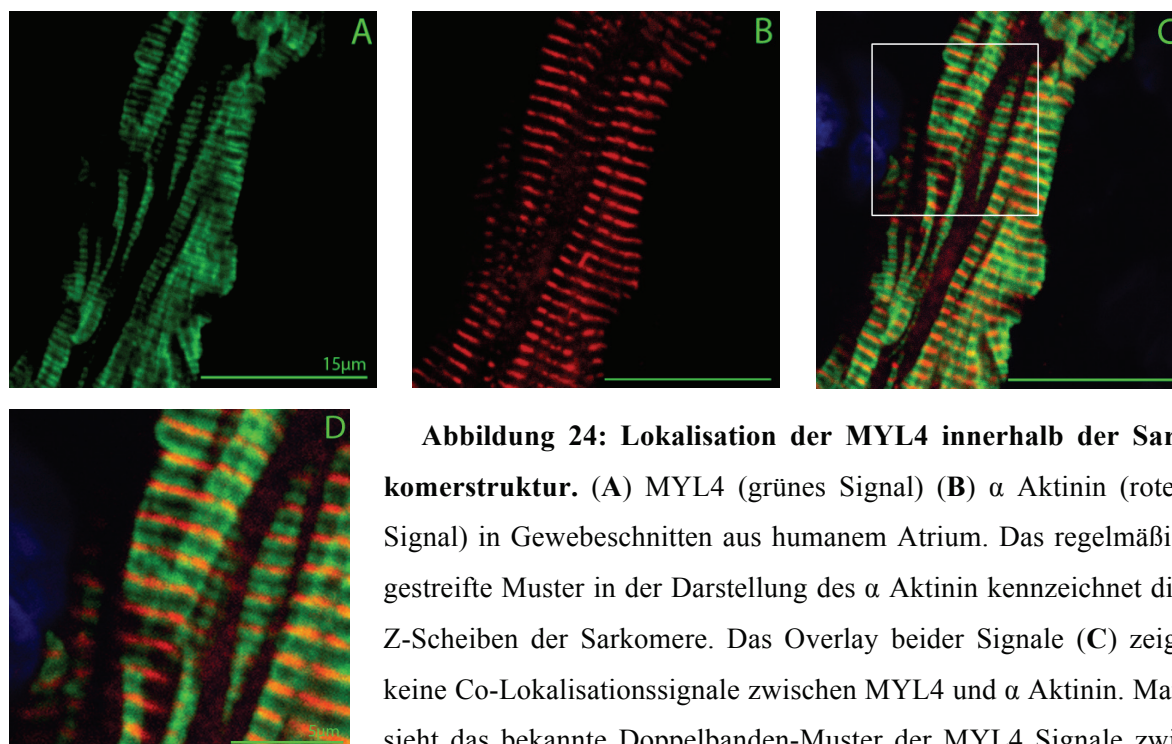


entsprechen innerhalb der Sarkomerstruktur den A-Banden, welche typischerweise die Myosinketten enthalten (vergleiche Abb. 3).



**Abbildung 23: Lokalisation von MYL4 in humanen Atrium.** MYL4 wurde mit dem Anti-MYL4 Antikörper (grünes Signal) markiert. In der Darstellung unter dem Konfokalmikroskop zeigen sich klar streifenartig strukturierte Muster. Die weiße Box markiert den Ausschnitt, welcher jeweils vergrößert dargestellt ist. (A) Vergrößerung 63fach, Skalierungsbalken 25 µm; (B) Vergrößerung 63fach plus 4fache Optischer Zoom, Skalierungsbalken 10 µm; (C) Vergrößerung 63fach plus 8fache Optischer Zoom, Skalierungsbalken 5 µm.

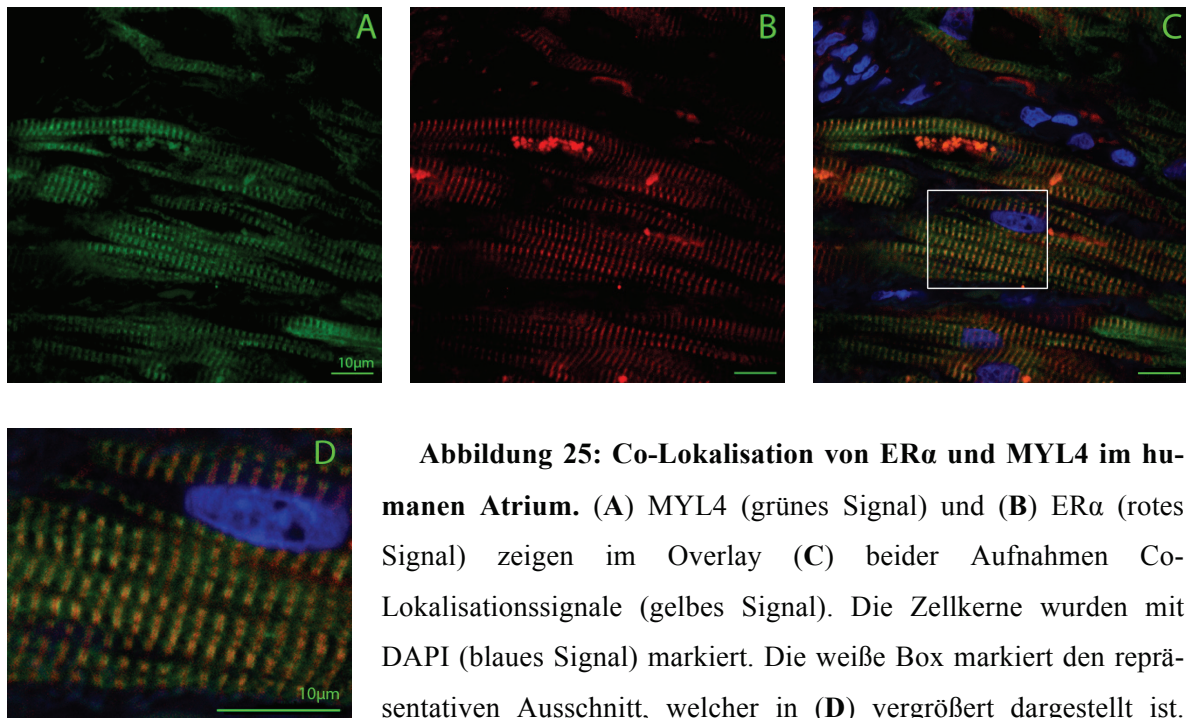
In einem nächsten Schritt sollte die spezifische Lokalisation der MYL4 innerhalb der Sarkomerbanden durch die Doppelfärbung mit  $\alpha$  Aktinin untersucht werden.  $\alpha$  Aktinin ist ein bekannter Marker für die Z-Scheiben und ermöglicht somit, die Signale des MYL4 Antikörpers entsprechenden Strukturen der Sarkomere zuzuordnen. Atriale Gewebeschnitte wurden hierzu einer Doppelfärbung mit Anti-MYL4 und Anti- $\alpha$  Aktinin unterzogen und nach Hybridisierung mit Sekundärantikörper unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Durch  $\alpha$  Aktinin (Abb. 24 B, rotes Signal) markierte Z-Scheiben stellten sich in regelmäßigem Wechsel mit den MYL4 (Abb. 24 A, grünes Signal) markierten Strukturen dar, ohne zu co-lokalisieren. Die Sarkomer-begrenzenden Z-Scheiben enthalten typischerweise kein Myosin. Diese Bereiche sind entsprechend in der Konfokalmikroskopie frei von MYL4 Signalen (Abb. 24 C und in D). Mit dieser Färbung konnte die Lokalisation des MYL4 zwischen den Sarkomer-begrenzenden Z-Scheiben im Bereich der A-Bande bestätigt werden.



**Abbildung 24: Lokalisation der MYL4 innerhalb der Sarkomerstruktur.** (A) MYL4 (grünes Signal) (B)  $\alpha$  Aktinin (rotes Signal) in Gewebeschnitten aus humanem Atrium. Das regelmäßig gestreifte Muster in der Darstellung des  $\alpha$  Aktinin kennzeichnet die Z-Scheiben der Sarkomere. Das Overlay beider Signale (C) zeigt keine Co-Lokalisierungssignale zwischen MYL4 und  $\alpha$  Aktinin. Man sieht das bekannte Doppelbanden-Muster der MYL4 Signale zwischen den Z-Scheiben, durch  $\alpha$  Aktinin markiert, in der Sarkomerstruktur des Herzmuskels. Die weiße Box markiert einen repräsentativen Ausschnitt, welcher in (D) vergrößert dargestellt ist. A-C: Skalierungsbalken 15  $\mu$ m; D: Skalierungsbalken 5  $\mu$ m.

#### 4.3.5 Die Co-Lokalisation von ER $\alpha$ und MYL4 in humanem Atrium

In den Gewebeproben, die mit spezifischen Antikörpern gegen MYL4 und ER $\alpha$  hybridisiert worden waren, zeigte sich nach Färbung mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper eine Co-Lokalisation zwischen ER $\alpha$  und MYL4. MYL4 (Abb. 25 A, grünes Signal) wird im bekannten Doppelstreifen-Muster detektiert. Der Anti-ER $\alpha$  Antikörper (Abb. 25 B, rotes Signal) liefert ein gestreiftes Muster, dessen Signale zwischen den Doppelbanden des MYL4 Signals lokalisieren. Die abwechselnd gestreifte Anordnung von MYL4 und ER $\alpha$  zeigt eine Co-Lokalisation im Übergangsbereich der MYL4- und ER $\alpha$ -Signale (Abb. 25 C und D, gelbes Signal). Dieser entspricht höchstwahrscheinlich der H-Zone innerhalb der sarkomerischen Struktur (vergleiche Abb. 3).



**Abbildung 25: Co-Lokalisation von ER $\alpha$  und MYL4 im humanen Atrium.** (A) MYL4 (grünes Signal) und (B) ER $\alpha$  (rotes Signal) zeigen im Overlay (C) beider Aufnahmen Co-Lokalisationssignale (gelbes Signal). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaues Signal) markiert. Die weiße Box markiert den repräsentativen Ausschnitt, welcher in (D) vergrößert dargestellt ist. Skalierungsbalken 10 $\mu$ m.

Mit vorliegendem Versuch konnte die Interaktion von ER $\alpha$  und MYL4 bestätigt und die Co-Lokalisation beider Interaktionspartner innerhalb des kontraktilen Apparates des Herzens dargestellt werden.

#### **4.4 Nachweis der Co-Lokalisation von ER $\alpha$ mit MCAD und MYL4 in der humanen Kardiomyozytenzelllinie AC16**

Die Daten der immunhistochemischen Färbungen im humanen Myokard wiesen auf eine Co-Lokalisation von ER $\alpha$  mit MCAD und MYL4 hin. Deshalb sollte im Folgenden der Einfluss von Östrogen auf die Lokalisation und Co-Lokalisation von MCAD, MYL4 und ER $\alpha$  untersucht werden. Für diese Immunofluoreszenzanalysen wurden AC16 Zellen eingesetzt. Die aus humanem linksventrikulärem Gewebe stammende Zelllinie eignet sich in diesem Falle besonders für die Untersuchungen, da sie die Eigenschaften einer primären Myozytenzelle zeigt und die zu untersuchenden Proteine MCAD, ER $\alpha$  sowie MYL4 endogen exprimiert. Zudem sind Zellen unter bestimmten Voraussetzungen hormonell stimulierbar (Vorarbeiten der Arbeitsgruppe), sodass sich der Einfluss von Östrogen direkt im Zellmodell untersuchen lässt.