

4.4.1 Östrogen moduliert die Lokalisation von MCAD, MYL4 und ER α

Der Einfluss einer Östrogenstimulation auf die Lokalisation von MCAD, MYL4 und ER α sollte in AC16 Zellen untersucht werden. Dazu wurden AC16 Zellen über 24 Stunden ausgehungert und anschließend mit 17 β -Östradiol oder Vehikel über 24 Stunden stimuliert oder mit dem Östrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182780 behandelt. Anschließend erfolgte die Fixierung und immunzytologische Färbung mit den jeweils spezifischen Antikörpern gegen MCAD, MYL4 und ER α . Nach Hybridisierung mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper wurden die Bilder mittels Konfokalmikroskopie dargestellt.

MCAD wurde mit Anti-MCAD Antikörper in elongierten, fibrillären Strukturen über das Zytoplasma verteilt detektiert (Abb. 26 A-F, grünes Signal). Dabei zeigte sich unter Stimulation mit 17 β -Östradiol im juxt nukleären Bereich der AC16 Zellen eine intensivere Signalgebung des MCAD Antikörpers sowie eine Vielzahl fokaler Signalanhäufungen, die als granuläre Konglomerate im Kernumfeld imponieren (Abb. 26, A-C). Im Vergleich dazu die mit Vehikel behandelten Proben (Abb. 26, D-F), welche eine insgesamt schwächer erscheinende und aufgrund der fehlenden granulären Signalhäufungen homogenere Verteilung der MCAD-Signale über das Zytoplasma zeigten. Dieses Verteilungsmuster entspricht dem Verteilungsmuster von Mitochondrien im Zytoplasma. Da die ICI 182780 behandelten Proben keine signifikanten Unterschiede zu den Vehikel behandelten Proben zeigten, sind nur letztere dargestellt.

Um die unspezifischen Bindungen des Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpers ausschließen zu können, wurden hierfür als Negativkontrolle alleinig der Sekundärantikörper (Fitc-konjugiert, grünes Signal) zur Färbung eingesetzt. Dabei wurden keine Fluoreszenzsignale durch unspezifische Bindungen detektiert (Abb. 26, G-I).

Zur Untersuchung des Einflusses von 17 β -Östradiol auf die Lokalisation von MYL4 und ER α wurden nach oben beschriebenem Versuchsaufbau AC16 Zellen mit 17 β -Östradiol stimuliert oder mit Vehikel bzw. ICI 182780 behandelt. Die Lokalisation von MYL4 abhängig von 17 β -Östradiol ist in Abbildung 31 dargestellt und beschrieben.

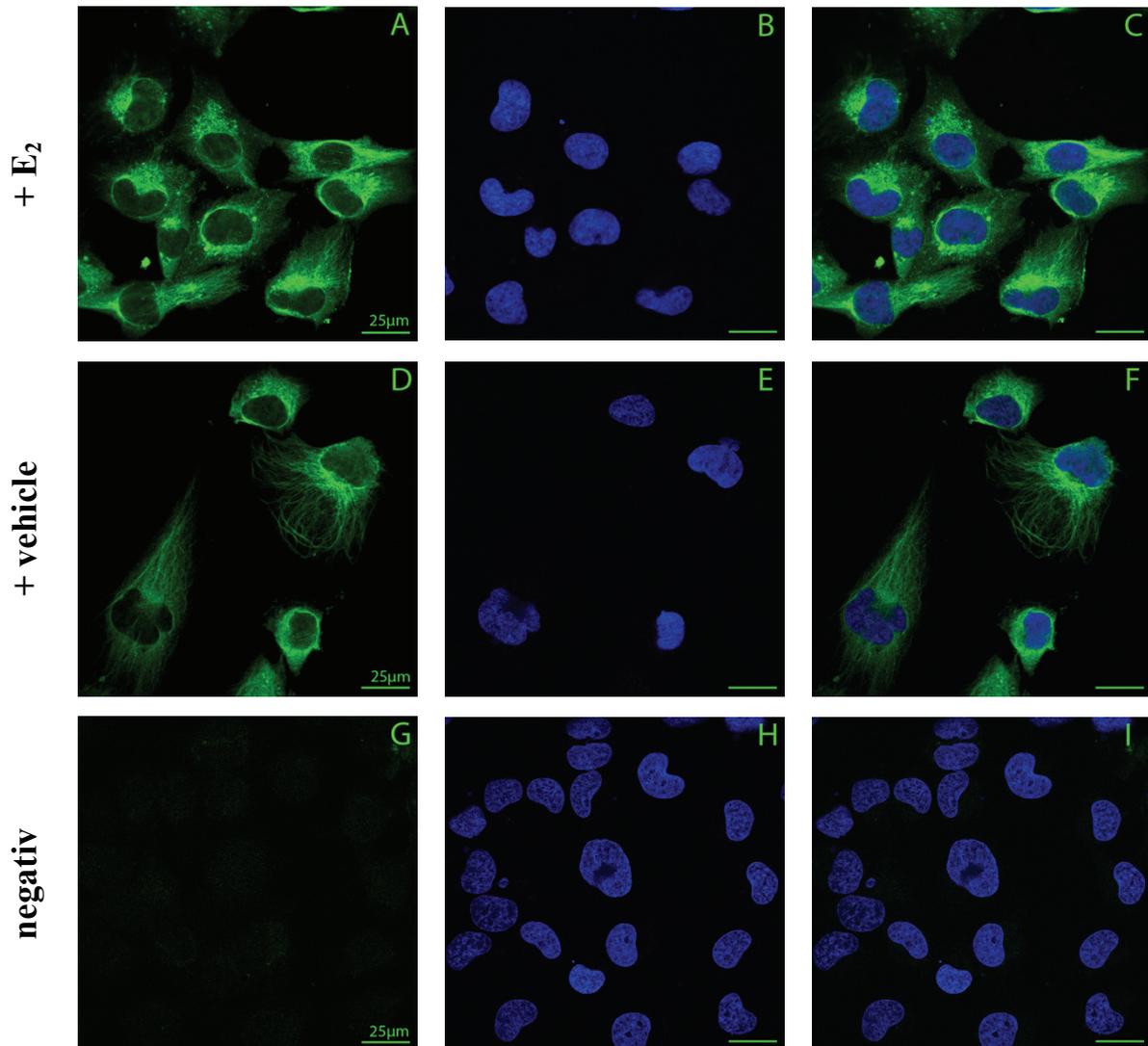


Abbildung 26: Lokalisation von MCAD in AC16 Zellen in Abhängigkeit von 17 β -Östradiol. Nach Stimulation mit 17 β -Östradiol (+E2) sind intensivere MCAD Signale (A und C, grünes Signal) im juxtannukleären Bereich beobachtbar. Unter Vehikel-Behandlung (+vehicle) ist die zytoplasmatische Verteilung von MCAD schwächer ausgeprägt und erscheint ohne granuläre Anhäufungen homogener (D und F). G-I zeigen die Negativ-Kontrolle, die durch Inkubation mit Fitc-konjugiertem-Anti-Maus Sekundärantikörper (grünes Signal) erfolgte. Zellkerne wurden mit DAPI (B und E, blaues Signal) markiert. Im Overlay mit Darstellung der Zellkerne sind keine unspezifischen Bindungen detektierbar. Skalierungsbalcken 25 μ m.

ER α konnte in den Zellkernen sowie im Zytoplasma der AC16 Zellen lokalisiert werden. Die Färbung mit spezifischem Anti-ER α und Fluoreszenz-konjugiertem Sekundärantikörper zeigte den ER α im Nukleus und im Zytoplasma der AC16 Zellen. Unter 17 β -Östradiol Stimulation sind eine Anreicherung des Rezeptors im Zellkern sowie verstärkte Signale im Zytoplasma (Abb. 27

A-C) im Vergleich zu Vehikel behandelten oder unbehandelten Zellen (Abb. 27 D-F) zu beobachten.

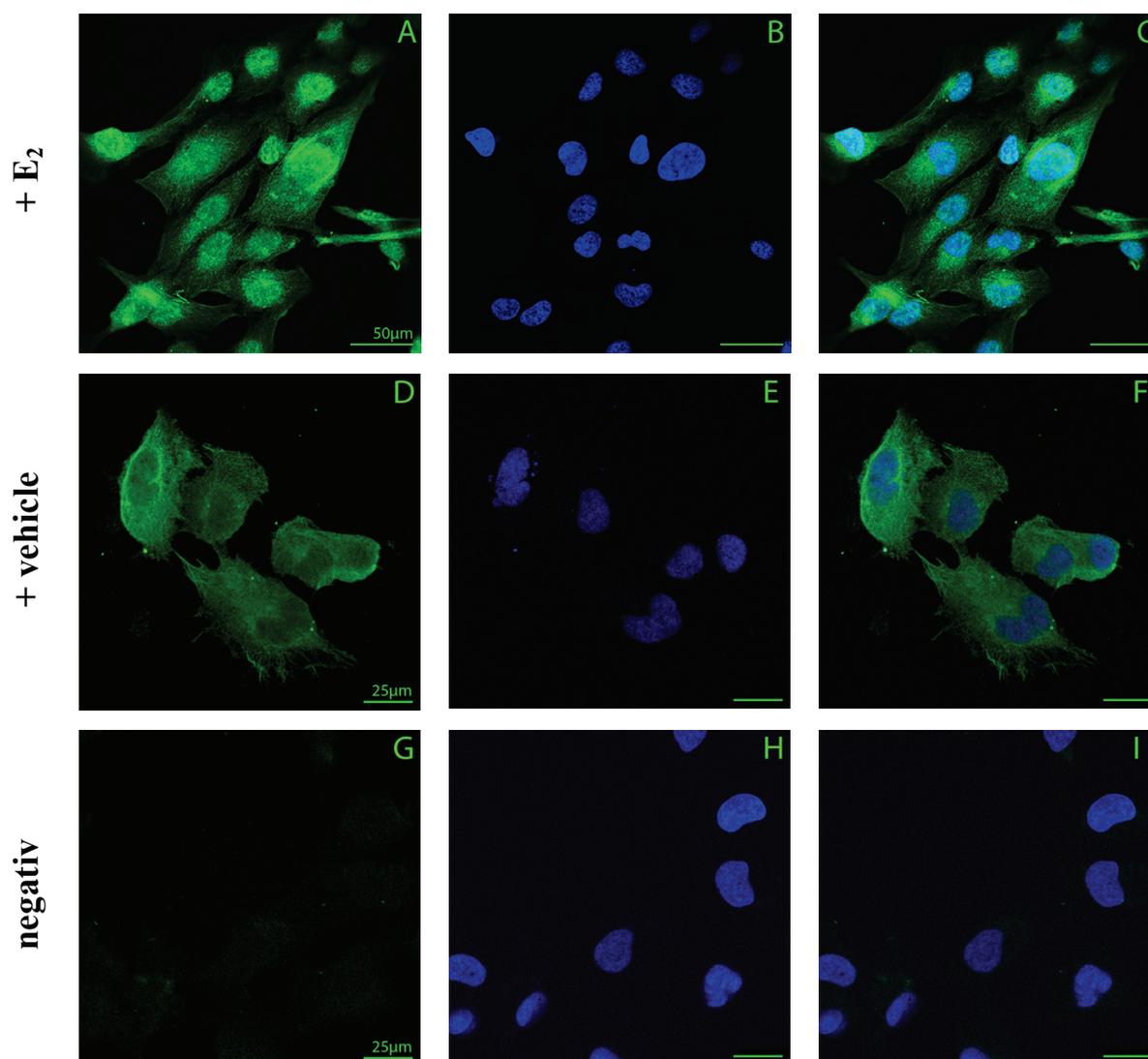


Abbildung 27: Lokalisation von ER α in AC16 Zellen in Abhängigkeit von 17 β -Östradiol. Nach Stimulation mit 17 β -Östradiol (+E2) sind die Signale des Anti-ER α Antikörpers stärker und zeigen durch Anreicherung insbesondere im nukleären Bereich die Aktivierung des ER α (A und C, grünes Signal). Behandlung mit Vehikel (+vehicle) zeigt eine insgesamt schwächere Signalgebung und im Kern nur schwache Signale für ER α (D-F). Die Negativkontrolle erfolgte durch Inkubation mit Fitc-Anti-Maus Sekundärantikörper und zeigt keine relevanten unspezifischen Bindungen (G-I, grünes Signal). Zellkerne wurden mit DAPI (blaues Signal) markiert. Skalierungsbalken A-C 50 μ m; D-I 25 μ m.

4.4.2 Lokalisation von ER α und MCAD in Mitochondrien von AC16 Zellen

Die Färbungen der AC16 Zellen mit Antikörper gegen MCAD hatten in vorhergehenden Versuchen das typische, elongiert erscheinende, perlschnurartige Verteilungsmuster der Mitochondrien

gezeigt. Zum Nachweis, dass es sich hierbei tatsächlich um Mitochondrien handelt, wurden diese in einem neuen Versuch mit einem selektiv Mitochondrien markierenden Farbstoff (MitoTracker CMX Ros) angefärbt. Der MitoTracker wurde dafür mit den AC16 Zellen für eine Stunde inkubiert, anschließend erfolgte die Hybridisierung mit dem Antikörper gegen MCAD. Die Färbungen zeigen die spezifischen Signale für MCAD im Bereich der markierten Mitochondrien (Abb. 28). Dargestellt sind AC16 Zellen, markiert mit MCAD (Abb. 28 A, grünes Signal) und MitoTracker (Abb. 28 B, rotes Signal). MCAD ist über das Zytoplasma der Kardiomyozyten verteilt detektierbar, wobei die dichtesten Signalintensitäten im Bereich um die Zellkerne zu beobachten sind. Die Zellkerne selbst hingegen bleiben frei von Signalen. Die Überlagerung der Aufnahmen (Abb. 28 C, gelbes Signal) zeigt die Co-Lokalisation von MitoTracker und MCAD. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass der MCAD-Antikörper die Zellareale markiert, in denen sich Mitochondrien befinden.

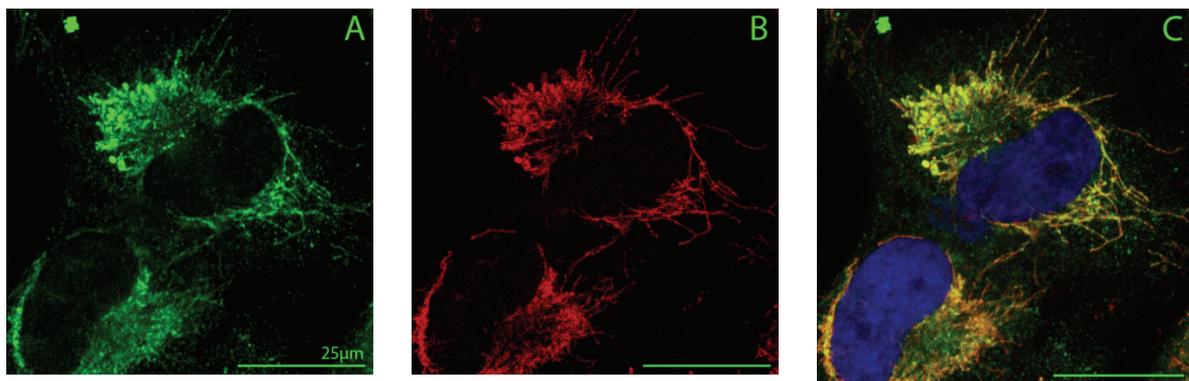


Abbildung 28: MCAD-Antikörper identifiziert Mitochondrien. Dargestellt ist die Co-Lokalisation von MCAD (A, Anti-MCAD, grünes Signal) und Mitochondrien (B, MitoTracker, rotes Signal), im Zytoplasma von AC16 Zellen. Das Overlay der Aufnahmen (C) zeigt die Assoziation von MCAD und Mitochondrien durch die gelbe Färbung. Kernfärbung mit DAPI (blaues Signal). Skalierungsbalken 25µm.

Das zelluläre Expressionsmuster von ER α in AC16 Zellen zeigt, dass ER α nicht nur im Nukleus sondern auch im Zytoplasma präsent ist. Untersuchungen an 17 β -Östradiol stimulierten AC16 Zellen zeigten die partielle Überlappung des ER α mit den markierten Mitochondrien. Zur Identifizierung der Mitochondrien wurden AC16 Zellen mit dem selektiven Mitochondrienmarker MitoTracker CMX Ros inkubiert, anschließend mit Anti-ER α Antikörper hybridisiert und mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper angefärbt. ER α konnte dabei in den Nuklei und im Zytoplasma der AC16 Zellen detektiert werden (Abb. 29 A, grünes Signal). Die zelluläre Verteilung der Mitochondrien zeigte sich in einem fädig imponierendem Muster, welches die Zellen durchzieht und fokale erhöhte Signalintensitäten zeigt, die ähnlich kleiner Granula imponieren (Abb. 29

B, rotes Signal). Im Overlay beider Aufnahmen ist durch Gelbfärbung die partiell deckungsgleiche Lokalisation von ER α und Mitochondrien markiert (Abb. 29 C, gelbes Signal). Diese Daten konnten die zytoplasmatischen Kompartimente, in denen ER α lokalisiert, als Mitochondrien identifizieren und zeigen erstmalig eine mitochondriale Fraktion des ER α in humanen Kardiomyozyten.

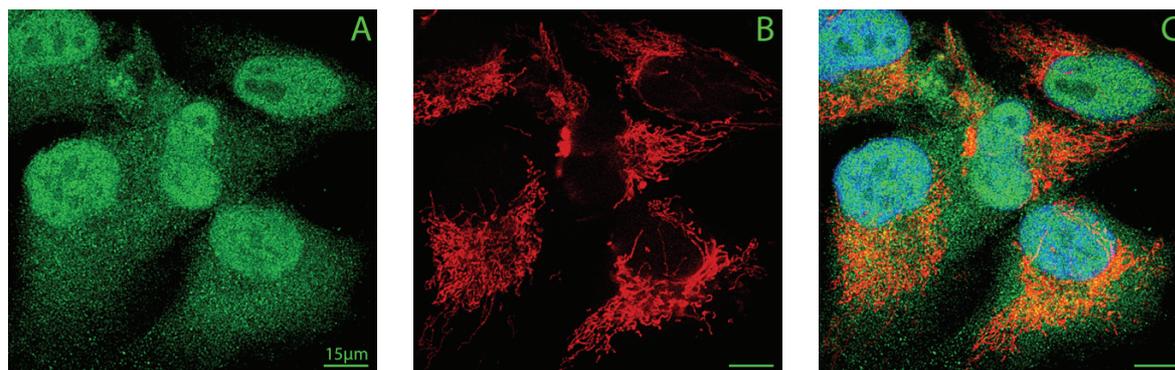


Abbildung 29: Mitochondriale Fraktion des ER α . Die Lokalisation von ER α in 17 β -Östradiol behandelten AC16 Zellen wurde mittels spezifischem Anti-ER α Antikörper in Zellkern und Zytoplasma der Kardiomyozyten detektiert (A, grünes Signal). Die Mitochondrien wurden durch Markierung mit Mitotracker CMX Ros im Zytoplasma der AC16 Zellen dargestellt (B, rotes Signal). Das Overlay beider Aufnahmen zeigt durch die Überlagerung beider Färbungen die mitochondriale Fraktion des ER α (C, gelbes Signal). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blaues Signal). Skalierungsbalken 15 μ m.

4.4.3 E2 vermittelte Co-Lokalisation von MCAD und ER α im Zytoplasma

Die erhobenen Daten konnten zeigen, dass MCAD tatsächlich in Mitochondrien der AC16 Zellen lokalisiert ist. Im nächsten Schritt sollte die Co-Lokalisation von MCAD und ER α und ein möglicher Einfluss von 17 β -Östradiol auf die Co-Lokalisation untersucht werden. Hierzu wurden AC16 Zellen für jeweils 24h mit 17 β -Östradiol stimuliert oder mit Vehikel behandelt und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen MCAD und ER α hybridisiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern gefärbt. Die Bildauswertung erfolgte unter dem Konfokalmikroskop.

Die Co-Lokalisation von MCAD und ER α konnte in AC16 Zellen mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden. Die Färbung für MCAD zeigte in 17 β -Östradiol stimulierten AC16 Zellen ein dichtes, fädig elongiertes Muster (Abb. 30 A, grünes Signal), im Vergleich zu Vehikel behandelten AC16 Zellen, in denen das Signal für MCAD schwächer ausfiel (Abb. 30 D). ER α erscheint

im Nukleus sowie im Zytoplasma in Anwesenheit von 17β -Östradiol, im Vergleich zur Versuchsreihe mit Vehikel behandelten Zellen, verstärkt nachweisbar (Abb. 30 B und E, rotes Signal). Im Overlay zeigen die Färbungen die Co-Lokalisation von MCAD und $ER\alpha$ in AC16 Zellen, wobei diese unter 17β -Östradiol Stimulation deutlich stärker ausgeprägt imponiert (Abb. 30 C und F, gelbes Signal).

Diese Daten zeigen die Co-Lokalisation von MCAD und $ER\alpha$ in AC16 Zellen, welche sich abhängig vom Einfluss von 17β -Östradiol verstärkt darstellt.

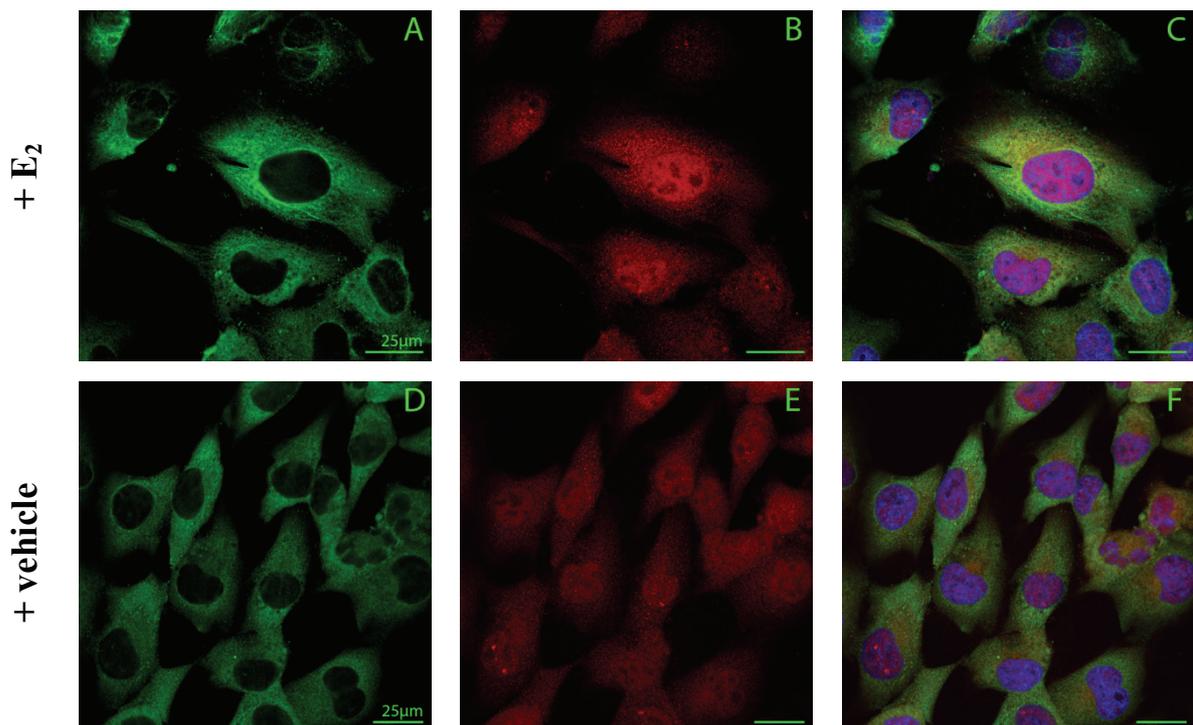


Abbildung 30: Co-Lokalisation von $ER\alpha$ und MCAD in AC16 Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse der 17β -Östradiol stimulierten (+ E2) oder Vehikel behandelten (+vehicle) AC16 Zellen nach Markierung mit Antikörpern gegen MCAD (grünes Signal) und $ER\alpha$ (rotes Signal). Die Stimulation mit 17β -Östradiol bewirkt ein verstärktes MCAD Signal im Zytoplasma (**A** vs. **D**), eine verstärkte Anreicherung von $ER\alpha$ im Zellkern (**B** vs. **E**) sowie ein verstärktes Co-Lokalisationssignal von $ER\alpha$ und MCAD im Zytoplasma gegenüber den Vehikel behandelten Zellen (**C** vs. **F**). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaues Signal) markiert. +E2: 17β -Östradiol stimulierte Zellen; +vehicle: Vehikel behandelte Zellen. Skalierungsbalken 25 μm .

4.4.4 Co-Lokalisation von MYL4 und ER α in Zytoplasma und Zellkern der AC16 Zellen

Immunfluoreszenzfärbungen an 17 β -Östradiol stimulierten und Vehikel behandelten AC16 Zellen zeigten die Co-Lokalisation von ER α und MYL4 (Abb. 31). Überraschenderweise sahen wir in den über 24h 17 β -Östradiol stimulierten Zellen eine Signalanreicherung für MYL4 im Bereich der Zellkerne (Abb. 31 A, grünes Signal) im Vergleich zu unbehandelten Proben (Abb. 31 D). Dieses Ergebnis war unerwartet, da eine nukleäre Form der MYL4 bislang nicht bekannt ist.

Im Zytoplasma ist die Verteilung der MYL4-Signale diffus gestreut und keine regelmäßige Musterung erkennbar. Dies ist dadurch erklärbar, dass in AC16 Zellen Strukturproteine der Kardiomyozyten exprimiert werden, diese allerdings nicht den geordneten Aufbau der Kardiomyozyten des menschlichen Herzens zeigen. Aufgrund dieser fehlenden Struktur sind die beobachteten Signale nicht einer Sarkomerstruktur zugeordnet, wie dies in den vorher gezeigten Aufnahmen der Gewebeproben der Fall war.

ER α zeigte unter 17 β -Östradiol Stimulation im Vergleich zu Vehikel behandelten Zellen eine vermehrte Anreicherung in AC16 Zellen insbesondere nukleär (Abb. 31 B und E). Bei Überlagerung beider Färbungen ist durch die gelb erscheinenden Signale im Zytoplasma eine Co-Lokalisation von MYL4 und ER α erkennbar, die sich unter Stimulation mit 17 β -Östradiol ausgeprägter darstellt (Abb. 31 C und F, gelbes Signal).

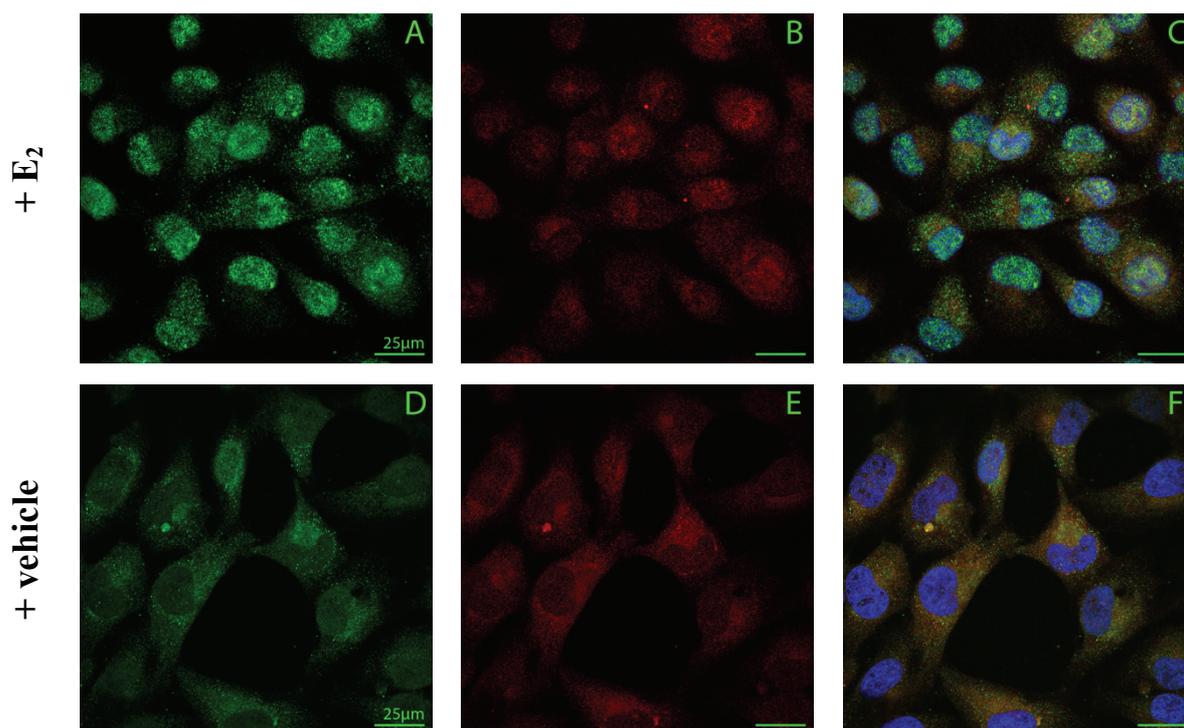


Abbildung 31: Co-Lokalisation von MYL4 und ER α in AC16 Zellen. Stimulation mit 17 β -Östradiol (+E2) bzw. Behandlung mit Vehikel (+vehicle) zeigte für Anti-MYL4 (grünes Signal) markierte Zellen eine Anreicherung des Signals im Bereich des Zellkerns (**A**), in Vehikel behandelten Zellen hingegen sieht man eine diffuse Fluoreszenzverteilung im Zytoplasma der Zellen (**D**). ER α (rotes Signal) ist unter Stimulation mit 17 β -Östradiol verstärkt angereichert im Zellkern wie auch im Zytoplasma beobachtbar (**B** vs. **E**). ER α und MYL4 co-lokalisieren im Zytoplasma und im Nukleus vermehrt unter Stimulation mit 17 β -Östradiol im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen (**C** vs. **F**). Kernfärbung mit DAPI (blaues Signal). +E2: 17 β -Östradiol stimulierte Zellen; +vehicle: Vehikel behandelte Zellen. Skalierungsbalken 25 μ m.

Die vorliegenden Daten konnten durch Co-Lokalisationsexperimente die Interaktion zwischen MYL4 und ER α im Zytoplasma von AC16 Zellen bestätigen. Der Einfluss von 17 β -Östradiol zeigt sich in einer verstärkten Co-Lokalisation beider Interaktionspartner in AC16 Zellen.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit die Interaktion von ER α mit MCAD bzw. MYL4 in Anwesenheit von 17 β -Östradiol nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte die Interaktion von MYL4 mit der EF-Domäne der ER α gezeigt werden. Die Co-Transformation mit N- und C-terminalen MYL4 Fragmenten zeigte die entscheidende Beteiligung des N-terminalen Proteinbereiches an der Interaktion. Alle diese Resultate konnten mittels β -Galaktosidase Assay bestätigt werden. Weiterhin konnten wir mit Hilfe der Konfokalmikroskopie die Lokalisation und Co-Lokalisation von ER α und MCAD bzw. MLY4 im humanen Herzen und in AC16 Zellen zeigen.

MYL4 konnte in einem ausgeprägt quergestreiften Muster im humanen Atrium lokalisiert werden und interagiert mit ER α im Bereich der H-Bande. In AC16 Zellen erschien MYL4 diffus verstreut und zeigte nach Stimulation mit 17 β -Östradiol zusätzlich eine Signalintensivierung und Interaktion mit ER α im Zellkern. MCAD ist in AC 16 Zellen hauptsächlich in Mitochondrien verteilt über das Zytoplasma nachweisbar, wohingegen im humanen Herzen longitudinale Strukturen markiert werden, welche mit ER α in einem regelmäßigen, intermyofibrillären Muster interagieren.

5 Diskussion

Östrogenrezeptoren vermitteln den überwiegenden Anteil der Östrogenwirkungen und spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation kardiovaskulärer Erkrankungen. Aufgrund der Bedeutung des Östrogens für geschlechtsspezifische Unterschiede bei Erkrankungen des Herzkreislauf-Systems sind die Östrogenrezeptoren seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Jedoch ist das Verständnis zur Rolle der Östrogenrezeptoren als Vermittler der Östrogenwirkung am humanen Herzen und in der Entwicklung und Progression von Erkrankungen des Myokards noch lückenhaft und die komplexen molekularen Grundlagen bleiben überwiegend ungeklärt. Neue Erkenntnisse zu molekularer Funktion und Wirkungsweise des ER α können durch die Analyse der Interaktionen des ER α mit zellulären Proteinen gewonnen werden. Vor diesem Hintergrund sollten die im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschriebenen Interaktionspartner des ER α , MCAD und MYL4, neue Erkenntnisse zu östrogenvermittelten Wirkungen im menschlichen Herzen liefern.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals MCAD und MYL4 als neue Interaktionspartner des humanen ER α im „Yeast-Two-Hybrid“ System nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MCAD und MYL4 nur mit dem Östrogen gebundenen ER α , nicht aber mit dem freien Rezeptor oder dem Antagonist-gebundenen ER α interagieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen im humanen Herzen stattfinden. Die Co-Lokalisation von ER α mit MCAD konnte im humanen Myokardgewebe und in Mitochondrien der linksventrikulären Kardiomyozytenzelllinie AC16 gezeigt werden. Zudem konnte ER α erstmals in den Mitochondrien der ventrikulären AC16 Zellen lokalisiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ER α mit MYL4 co-lokalisiert, was im humanen Herzgewebe und AC16 Zellen nachgewiesen werden konnte.

5.1 Rolle der Östrogenrezeptoren im gesunden und kranken Herzen

Der Einfluss der Östrogene auf das kardiovaskuläre System sind lang vor der Entdeckung der Östrogenrezeptoren beschrieben worden. Mit der Entdeckung der Östrogenrezeptoren im Myokard konnten Herz und Gefäßsystem als Zielorgan für Östrogenwirkung identifiziert werden.^{39, 40}

Die Expression des ER α wurde in zytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten sowie im Bereich der Glanzstreifen humaner Kardiomyozyten gezeigt.³⁹ Ropero *et al.* lokalisierten ER α im Bereich der T-tubulären Membran und legen den Schluss nahe, dass diese Rezeptorkomplexe

spezifisch der Vermittlung nicht-genomischer Östrogeneffekte in Herzmuskelzellen dienen. Expression und Lokalisation des ER α im humanen Herzen unterliegen zudem einer krankheitsbedingten Regulation, wie Untersuchungen von Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Aortenklappenstenose zeigen.^{39, 41} Darüber hinaus ist eine unterschiedliche Verteilung des ER α innerhalb des Myokards beschrieben. Lizotte *et al.* demonstrierten im Vergleich mit dem Atrium eine vermehrte Expression des ER α im Ventrikel von Mäusen.⁶⁸ Diese Daten lassen auf eine besondere Rolle des ER α für die Funktion des ventrikulären Myokards schließen.

Wesentliche Erkenntnisse zur Bedeutung der Östrogenrezeptoren stammen aus tierexperimentellen Studien, in denen durch pharmakologische Manipulation oder spezifische Knock-Out Modelle die Bedeutung des ER α im Myokard untersucht wurde. In einem Mausmodell mit Deletion von ER α (ERKO) konnte gezeigt werden, dass Myokardischämie in ERKO Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu weit ausgeprägterer Schädigung des Myokards führte, ein Effekt, der besonders deutlich für das weibliche Geschlecht beobachtet wurde.^{69, 70}

Es ist eine Vielzahl von Östrogen vermittelten Effekten beschrieben, die einer zell- und gewebe-spezifischen Regulation unterliegen.^{71, 72} Dies weist auf die Bedeutung weiterer Faktoren für die ER α vermittelten Effekte hin, welche durch direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem Östrogenrezeptor auch Signalwege außerhalb des Nukleus beeinflussen können.^{73, 74}

Allerdings wurden bislang nur wenige herzspezifische Interaktionspartner des ER α beschrieben (siehe Abschnitt 1.3). Mit der vorliegenden Arbeit konnten mit MCAD bzw. MYL4 zwei neuartige Interaktionspartner des ER α im humanen Herzen identifiziert werden, die von entscheidender Bedeutung für den Energiestoffwechsel des Myokards bzw. bedeutsam für die kontraktilen Eigenschaften des Myokards sind. Auf Grundlage dieser Interaktionen lassen sich mögliche molekulare Mechanismen aufzeigen, über die ER α geschlechterspezifische Unterschiede in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen vermitteln kann.

5.2 Nachweis der Interaktion des humanen ER α mit MCAD und MYL4 im „Yeast-Two-Hybrid“

MCAD und MYL4 als Interaktionspartner von ER α konnten in „Yeast-Two-Hybrid“ Experimenten identifiziert und bestätigt werden. Dabei handelte es sich um eine Liganden-abhängige Interaktion, die ausschließlich in Anwesenheit von 17 β -Östradiol beobachtbar war. Darüber hinaus konnten weitere Untersuchungen im „Yeast-Two-Hybrid“-System die an dieser Interaktion be-

teiligten Proteindomänen bestimmen. Dabei wurde gezeigt, dass die Interaktion von ER α mit MCAD ausschließlich im Beisein des vollständig exprimierten Östrogenrezeptors stattfand.

Hingegen konnte für MYL4 in Anwesenheit von Östrogen zusätzlich eine Interaktion mit der EF-Domäne des ER α gezeigt werden. Die EF-Domäne des ER α ist als Liganden-bindende Domäne bekannt^{38, 75, 76} und ist bedeutend im Kontext der Interaktionen des ER α mit verschiedenen bekannten interagierenden Proteinen.⁷⁷

Eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb zellulärer Prozesse werden über bestimmte Motive vermittelt. In diesem Zusammenhang ist das LxxLL-Motiv beschrieben, welches zahlreiche Interaktionen des ER α mit weiteren Proteinen vermittelt und in einer großen Anzahl von Co-Aktivatoren des ER α nachgewiesen werden konnte.^{43, 44, 78-80} Dabei handelt es sich um ein leucinreiches Motiv, wobei L für Leucin und x für beliebige weitere Aminosäuren steht. Eine komplementäre Tasche im Bereich der EF-Domäne des ER α bildet die Kontaktoberfläche des Rezeptors (nach Heery, Kalkhoven *et al.*, Nature 1997).⁷⁸

Weder MCAD noch MYL4 weisen das LxxL-Motiv auf. Das Fehlen bekannter Motive, welche Bindungsstellen für Protein-Protein-Interaktionen darstellen, lässt Spielraum für eine Reihe weiterer Möglichkeiten. Das LxxL-Motiv ist häufig in sehr stabile Protein-Interaktionen involviert, somit wäre für die Interaktion von ER α mit MCAD oder MYL4 ein dynamisches Geschehen vorstellbar, welches auf eine transitorische Interaktion zwischen ER α und dem Interaktionspartner hinweisen könnte. Es kann sich bei den gezeigten Interaktionen zwischen ER α und MCAD bzw. MYL4 um noch unbekannte Interaktionsmechanismen handeln, nicht zuletzt da eine Vielfalt an Protein-Protein-Interaktionen über sehr kurze Bereiche, oft weniger als zehn Aminosäuren lang, vermittelt werden können.⁸¹

Über die Expasy Datenbank konnte im N-terminalen Bereich der MYL4 ein PxxP-Motiv identifiziert werden (Abb. 32). Das PxxP-Motiv wird durch Prolin und zwei beliebige weitere Aminosäuren gebildet und erstreckt sich über die N-terminalen Aminosäuren 31-34 der MYL4. Die N-terminale Prolinreiche Sequenz vermittelt die Interaktion der MYL4 mit dem Aktin-Myosin-Komplex über SH3 Domänen des Myosins.⁸²

5.3 Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von ER α mit MYL4

5.3.1 MYL4 verbessert die Kontraktilität des Myokards

Die in vorliegender Arbeit identifizierte atriale MYL4 wird normalerweise nur fetal im gesamten Herzen exprimiert und bleibt postnatal auf das Atrium beschränkt. Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es zu einer ventrikulären Re-Expression der MYL4, welche mit einer verbesserten Kontraktilität der betroffenen Herzen assoziiert ist.^{63, 85, 62, 86} Abdelaziz *et al.* entwickelten ein transgenes Rattenmodell, welches die humane MYL4 im Ventrikel überexprimiert und konnten in diesem eine Steigerung der kontraktile Parameter im Vergleich zu den Kontrolltieren messen.⁸⁷

Entscheidend für den Kontraktilitätssteigernden Effekt der MYL4 benennen Morano *et al.* die Aktin-Affinität der Myosin-Leichtketten.⁶⁴ Die atriale MYL4 zeigt im Vergleich zur ventrikulären Isoform eine deutlich schwächere Aktin-Bindungsaffinität. Diese Affinitätsminderung erleichtert Bindung und Lösung der Myosin-Aktin Verbindungen innerhalb eines Kontraktionszyklus der Myokardfasern und steigert über die Myosin-Aktin Querbrückenkinetik die Kontraktilität der Muskelfasern.^{64, 88}

Der N-terminale Abschnitt der MYL4 ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, da in diesem Bereich die Aktin-Myosin-Bindung der MYL4 stattfindet.^{89, 82}

Interessanterweise konnte mit unseren Daten genau dieser N-terminale Bereich der MYL4, MYL^{AS 1-55}, als relevanter Bereich für Interaktion mit ER α im „Yeast-Two-Hybrid“ System identifiziert werden. Die N-terminalen Aminosäuren der MYL4 formen einen aus dem Molekül frei herausragenden „Arm“, der eine etwa 8 nm lange Brücke zum Aktinfilament schlägt (Abb. 33, blau markiert).^{88, 85} Darüber wird die Interaktion mit dem Aktin-Myosin-Komplex vermittelt, einerseits über Ionenbindungen (Aktin) und andererseits über SH3 Domänen des Myosins, die mit dem PxxP-Motiv der N-terminalen MYL4 interagieren.^{82, 85} Die daraus resultierende veränderte Aktin-Bindungsaffinität erleichtert Assoziation sowie Dissoziation des Aktin-Myosin Komplexes innerhalb eines Kontraktionszyklus und verbessert so die Kontraktilität der Muskelfaser.

Dass der N-terminale Bereich der MYL4 für die Kontraktilität des Myokards eine entscheidende Rolle spielt, konnte durch eine Untersuchung an transgenen Ratten bestätigt werden, die im Her-

zen ausschließlich den N-terminalen Anteil der MYL4 überexprimierten. Die transgenen Tiere erreichten eine deutlich verbesserte myokardiale Kontraktilität gegenüber den Kontrolltieren.⁹⁰

Die Interaktion zwischen ER α und der N-terminalen MYL4 wäre ein möglicher Mechanismus, über welchen Östrogeneffekte auf die Muskelkontraktilität vermittelt werden können.

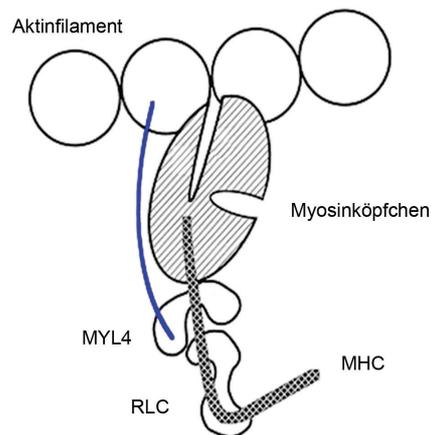


Abbildung 33: Interaktion der N-terminalen MYL4 mit dem Aktin-Myosin-Komplex. Die Zeichnung zeigt die N-terminalen Aminosäuren der MYL4, die einen aus dem Myosin Molekül frei herausragenden „Arm“ formen, der eine etwa 8 nm lange Brücke zum Aktinfilament schlägt (blau markiert). Myosinköpfchen (grau-weiß schraffiert) interagiert mit dem Aktinfilament. Die Myosin-Leichtketten, atriale MYL4 und die regulatorische Leichtkette (RLC) sind in der ‚neck-region‘ des Myosins lokalisiert. MHC bezeichnet die helikal gewundene Myosin-Schwerkette. Modifiziert nach Schaub *et al.*⁸⁸

5.3.2 Die Rolle der Östrogene in der Muskelfunktion

Unterschiede zwischen den Geschlechtern -bezogen auf deren Muskelfunktion- sind seit langem bekannt und umfassen die Zusammensetzung der Muskelfasern, Kontraktionsgeschwindigkeit und Energiestoffwechsel.⁹¹ Geschlechterunterschiede sind auch für die kardiale Muskelleistung bekannt. Dies zeigte unter anderem die Beobachtung, dass unter herzinsuffizienten Patienten Frauen im Vergleich zu Männern sehr viel häufiger eine konservierte systolische Pumpfunktion aufweisen.⁹² Eine Beteiligung der Östrogene an der Ausprägung dieser Unterschiede ist naheliegend, allerdings ist das Verständnis über zugrunde liegende molekulare Prozesse noch sehr lückenhaft.

5.3.2.1 *ER α und Muskelkontraktilität*

Verschiedene Studien konnten eine protektive Wirkung des Östrogens auf muskuläre Schädigung mit nachfolgendem Kontraktilitätserhalt zeigen. Am Mausmodell konnte eine Minderung der kontraktiven Muskelfunktion an ovariectomierten Mäusen demonstriert werden, die durch Östrogensubstitution aufhebbar war.⁹³ Brown *et al.* fanden durch Untersuchungen an ER α Knock-Out Mäusen Hinweise darauf, dass die Effekte von Östrogen auf die Kontraktilität der Muskeln durch ER α vermittelt werden.⁹⁴ In Anlehnung dazu konnte in Kaninchen ein verbessertes Outcome des Ischämie-beschädigten Herzens unter Behandlung mit ER α Agonisten beobachtet werden.²¹ In ovariectomierten SHR Ratten führte die Behandlung mit ER α Agonisten zu einer Verbesserung der kardialen Auswurfleistung.¹⁹ Jedoch ist über die zugrunde liegenden Mechanismen der Wirkung von Östrogen im Muskel bisher wenig bekannt. Brown *et al.* konnten in ihrer Studie signifikante Unterschiede in der Muskelspannungsentwicklung in ER α -Knock-Out Tieren im Vergleich zu Wildtypen zeigen.⁹⁴ Allerdings waren diese Unterschiede nicht in allen untersuchten Muskelarten vorhanden, sondern scheinen typspezifisch aufzutreten, was eine Beteiligung weiterer Faktoren wahrscheinlich macht. Dies könnte durch interagierende Proteine im Komplex mit ER α geschehen. Die in unseren Daten gezeigte Interaktion des ER α mit MYL4 im humanen Myokard ist ein möglicher Mechanismus, über welchen ER α Einfluss auf die Muskelkontraktilität des Myokards nehmen kann.

Die Expression des ER α innerhalb der myofibrillären Struktur ist bereits beschrieben worden.⁹⁵ ⁹⁶ In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Färbungen wurde ER α im Myokard männlichen und weiblichen Geschlechts nachgewiesen. Die Signale des ER α im humanen Myokard stellten sich in einem quergestreiften Muster in ventrikulären wie atrialen Kardiomyozyten dar. Dieses Expressionsmuster ist vergleichbar mit weiteren Arbeiten, die ER α im menschlichen Myokard bzw. im Ratten-Myokard zeigen.^{39, 34}

MYL4 konnte in dieser Arbeit im humanen Myokard ebenfalls in quergestreifter Anordnung regelmäßiger Doppelbanden lokalisiert werden (Abb. 23-25). α Aktinin-markierte Z-Scheiben stellten sich in regelmäßigem Wechsel mit den MYL4 markierten Strukturen dar, ohne zu colokalisieren. Doppelfärbungen mit α Aktinin dienten in diesem Fall der Identifikation der markierten Sarkomerelemente, da dieses als sarkomerisches Gerüstprotein quergestreifter Muskelzellen Aktinfilamente auf Höhe der Z-Scheiben bindet.⁹⁷

Unsere Daten weisen auf die Lokalisation der MYL4 im Bereich der Myosin-haltigen A-Banden innerhalb des Sarkomers hin. A-Banden sind zwischen den Z-Scheiben lokalisiert, die typi-

schersweise kein Myosin enthalten.⁸⁸ Dies konnte in den Immunofluoreszenz-Studien dieser Arbeit korrekt dargestellt werden und steht in Übereinstimmung zu Daten aus tierexperimentellen Studien, welche die atriale Myosin-Leichtkette im Herzmuskelgewebe lokalisieren konnten.^{87, 98}

Doppelfärbungen für MYL4 und ER α zeigten eine abwechselnd gestreifte Anordnung für ER α und MYL4, die bei Überlagerung der Fluoreszenzbilder schmale Banden deckungsgleicher Areale offenbarten. Vor diesem Hintergrund co-lokalisieren ER α und MYL4 am wahrscheinlichsten im Bereich der H-Zone zwischen den A-Banden eines Sarkomers (Abb. 34).

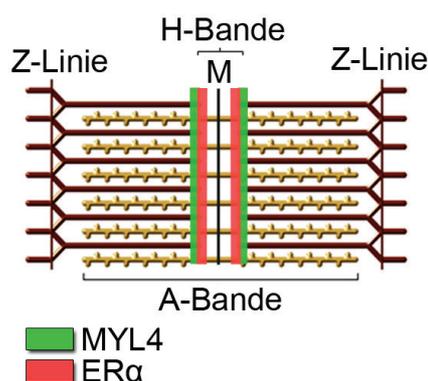


Abbildung 34: Schematisches Modell der Interaktion von ER α und MYL4. ER α (rot) und MYL4 (grün) interagieren im Bereich der H-Bande des Sarkomers. Das Modell zeigt ein Sarkomer, begrenzt durch zwei Z-Scheiben, bestehend aus Myosin- (gelb) und Aktinmolekülen (braun). Die Myosinmoleküle befinden sich innerhalb der A-Bande des Sarkomers, die in ihrem Zentrum eine Aktin-freie Zone zeigen, die sogenannte H-Bande.

Tatsächlich verweisen die Daten dieser Arbeit auf eine Assoziation des ER α mit MYL4 innerhalb der Sarkomere von Herzmuskelzellen. Dies legt eine Bedeutung des ER α für die muskuläre Funktion nahe. Beschriebene Effekte des Östrogens auf kontraktile Eigenschaften des Myokards könnten möglicherweise durch einen ER α -MYL4 Komplex vermittelt werden.

In vorliegender Arbeit zeigen wir erstmals die Interaktion des ER α mit dem kontraktilem Protein MYL4 im menschlichen Herzen. Von allen bekannten Interaktionspartnern des ER α im Myokard ist dies der erstmalige Nachweis einer Interaktion von ER α mit einem Teil des Myosin Motor-Proteins.

Für MYL4 ist bekannt, dass es kontraktile Eigenschaften der Muskelfaser verbessert.^{98, 60, 99} MYL4 moduliert die Aktin-Myosin Bindung und beeinflusst dadurch die Kontraktilität der Muskelfasern, welche eine erhebliche Abhängigkeit von der Aktin-Myosin Interaktion zeigt.^{60, 64, 85}

Hypothetisch gedacht könnte ER α im Komplex mit MYL4 durch Modulation der Aktin-Myosin Bindungen in den Herzmuskelzellen die Kontraktilität des gesamten Myokards verbessern.

5.3.2.2 Östrogen und Apoptose im Myokard

Einen weiteren Aspekt der Östrogenwirkung in Hinblick auf Geschlechterunterschiede der kardialen Funktion stellen Prozesse der Apoptose dar. Diese spielen eine Rolle in einer Reihe von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, deren Endpunkt die terminale Herzinsuffizienz darstellt.¹⁰⁰ Dabei handelt es sich um eine Art des programmierten Zelltodes, bei dem eine Reihe von zellulären Signalkaskaden aktiviert werden und den kontrollierten Zelltod einleiten. In Kardiomyozyten führt dies zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und der Aktivierung proteolytischer Caspasen. Caspase3 ist eines der Schlüsselenzyme in der Spaltung zellulärer Bestandteile und zeigt direkte Auswirkungen auf die kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten.^{101, 102} Die Aktivierung der Caspase3 wurde unter anderem im Myokard von Patienten mit terminalem Herzversagen identifiziert.¹⁰³ Im Ventrikel von Kaninchenherzen konnte durch Aktivierung der Caspase3 ein Kontraktilitätsverlust der ventrikulären Myozyten nachgewiesen werden.¹⁰² Allerdings bleiben die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bislang unklar.

Möglicherweise steht dieser Verlust der kardialen Kontraktilität mit dem Verlust von MYL4 durch Caspase-Aktivierung im Zusammenhang. MYL4 wird im hypertrophierten Ventrikel re-exprimiert und verbessert die globale Kontraktilität des Myokards.^{104, 63, 85, 62, 105} Unter Progredienz der Herzinsuffizienz vom kompensierten Stadium hin zum terminalen Herzversagen fällt die ventrikuläre Expression der MYL4 unter die Nachweisgrenze (Morano *et al.*, persönliche Kommunikation).

Indem unter hypertrophen Stimuli MYL4 kompensatorisch reguliert und vermehrt exprimiert wird, geht diese Expression bei zunehmender Dekompensation der Herzinsuffizienz erneut zurück. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der proteolytische Abbau der MYL4 im insuffizienten Myokard sein. So konnten Communal *et al.* durch *in-vitro* Untersuchungen an Kaninchen- und Rindermuskel zeigen, dass myofibrilläre Proteine durch Caspasen proteolytisch abgebaut werden.¹⁰⁶ Arbeiten von Moretti *et al.* identifizierten die Myosin-Leichtkette als Zielprotein der Caspase3, die im dekompenzierten Kaninchenherzen den proteolytischen Abbau der Myosin-Leichtkette bedingte.¹⁰⁷ Moretti *et al.* untersuchten in ihrer Studie die ventrikuläre Isoform der Myosin-Leichtkette, die atriale Myosin-Leichtkette war in der Untersuchung nicht berücksichtigt worden (Moretti *et al.*, persönliche Kommunikation). Dies ist deshalb von Bedeutung, da die

beschriebene Zielsequenz der Caspase3, DFVE¹³⁵G, im C-terminalen Bereich der Myosin-Leichtkette liegt, in welchem die atriale und ventrikuläre Isoform eine starke Homologie ihrer Aminosäuresequenzen aufweisen.^{56, 89} So ist die Schnittsequenz der Caspase3 in identischer Aminosäurefolge im C-terminalen Bereich der atrialen MYL4 zu finden.⁶¹ Es ist unter diesen Umständen durchaus vorstellbar, dass MYL4 ein Zielprotein der Caspase3 darstellt und durch diese degradiert wird. Dies spricht dafür, dass die kompensatorische Re-Expression der MYL4 durch Apoptoseprozesse im Myokard aufgehoben wird, mit der Folge einer zunehmenden Dekompensation des Myokards.

In Anlehnung an Daten aus Studien, welche eine Östrogen bedingte Reduktion der Caspase3 Aktivität im Myokard von Mäusen bzw. im Zentralnervensystem zeigen konnten, lässt sich spekulieren, dass die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion zwischen ER α und MYL4 die atriale Myosin-Leichtkette auf noch nicht bekanntem Weg vor einem proteolytischen Abbau durch die Caspase3 schützt.^{108, 109, 110} Vorstellbar wäre hypothetisch eine Konformationsänderung der MYL4 bedingt durch die Interaktion mit ER α , welche eine Bindung und proteolytische Aktivität der Caspase3 verhindert und MYL4 somit Schutz vor der Degradation durch die Caspase3 bietet. Auf diesem Wege könnte Östrogen dazu beitragen, die Kontraktilität des Myokards zu erhalten. Dies wäre ein möglicher Ansatzpunkt, über welchen sich Geschlechterunterschiede in der systolischen Pumpfunktion, die zwischen Frauen und Männern mit Herzinsuffizienz beobachtet werden können, erklären lassen.

Zur Stützung dieser Hypothese müsste in weiterführenden Versuchen gezeigt werden, dass MYL4 tatsächlich ein Substrat der Caspase3 darstellt. Dies könnte in Anlehnung an die Arbeit von Communal et al. durch Verfügbarkeit einer rekombinanten Caspase3 in einem *in-vitro* Assay realisiert werden. In weiteren Schritten ermöglichen eine induzierte Caspase3 Aktivierung und die 17 β -Östradiol Stimulation in Zellkultur die Auswirkungen auf die Expression der MYL4 zu untersuchen.

5.3.3 ER α beeinflusst die Expression von MYL4

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war, dass ER α in Zellkultur die Expression von MYL4 beeinflusst. Um den Einfluss von Östrogen auf die Interaktion von MYL4 und ER α untersuchen zu können, erfolgten Stimulationsversuche mit 17 β -Östradiol in Zellkultur. Immunofluoreszenzfärbungen an AC16 Kardiomyozyten lokalisierten ER α im Zytoplasma und im Nukleus. Nach der Stimulation mit Östrogen war im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine deutliche Verschiebung des ER α vom Zytoplasma in den Nukleus beobachtbar. Diese zeigt die Aktivierung des

Rezeptors durch die Östrogenbindung an, welche bereits beschrieben wurde.⁴⁰ AC16 Zellen exprimieren Muskelstrukturproteine gleich den Kardiomyozyten.⁶⁷ Allerdings ist eine Zuordnung zu definierten Strukturen des Sarkomers nicht möglich, da es sich um nicht ausdifferenzierte ventrikuläre Kardiomyozyten handelt, welche keine organisierte Sarkomerstruktur ausbilden.

MYL4 konnte in AC16 Zellen diffus im Zytoplasma der Kardiomyozyten verteilt lokalisiert werden. Unter Stimulation mit Östrogen wurden verstärkte Signale für MYL4 im Zytoplasma und überraschenderweise im Zellkern beobachtet. Diese Ergebnisse waren insofern unerwartet, als MYL4 selbst kein nukleäres Signalpeptid besitzt. Auch in der Literatur finden sich hierzu keine Hinweise. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass MYL4 an der Regulation der eigenen Expression beteiligt ist. Ein interessanter Aspekt ist in diesem Zusammenhang die in der Literatur beschriebene unveränderte absolute Anzahl der essentiellen Myosin-Leichtketten im Ventrikelmyokard, welche sich auch unter ventrikulärer Re-Expression der atrialen MYL4 nicht verändert. Dies bedeutet, dass die ventrikuläre Myosin-Leichtkette in entsprechendem Maße gegenreguliert wird.^{88, 98, 86} Dieser Shift von ventrikulärer zu atrialer Myosin-Leichtkette bei gleichbleibender Gesamtanzahl der essentiellen Myosin-Leichtketten konnte unabhängig davon beobachtet werden, ob es sich um eine vermehrte Expression von MYL4 in Folge von Re-Expression durch pathophysiologische Anpassung des Myokards an erhöhte Belastung oder eine transgene Überexpression von MYL4 im Ventrikelmyokard handelte.^{59, 87} Die Regulationsmechanismen dieses Prozesses sind noch unklar.

Insofern lässt sich spekulieren, dass MYL4 im Zellkern auf noch unbekanntem Wege gemeinsam mit ER α seine eigene Expression regulieren könnte. Als dominante Isoform der essentiellen Myosin-Leichtketten im Ventrikel würde MYL4 zu einer verbesserten Kontraktilität des Kammermuskels führen.^{87, 88, 63} Der östrogenaktivierte ER α könnte dabei als Transkriptionsfaktor mit MYL4 als Cofaktor die nukleäre Translokation ermöglichen und im Komplex mit MYL4 im Zellkern die Expression der MYL4 regulieren.

Die Daten der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass MYL4 unter Stimulation mit 17 β -Östradiol in den Kardiomyozyten verstärkt exprimiert wird und eine Translokation in den Zellkern zeigt. Das Östrogen kontraktile Proteine regulieren kann, ist in der Literatur beschrieben. Pelzer *et. al.* konnten in ihrer Studie zur Östrogenwirkung am Myokard eine Östradiol-abhängige Myosin-Schwerketten Heraufregulation zeigen.²³ Daher wäre es denkbar, dass 17 β -Östradiol die Expression von MYL4 ebenfalls reguliert.

Weitere Untersuchungen wären nötig, um die aufgestellte Hypothese zu prüfen. Mittels gezielter Kernfraktionierung kann der Nachweis der MYL4-Anreicherung nach 17β -Östradiol Stimulation in den Nuklei der Kardiomyozyten geführt werden. Eine Bindung des MYL4-ER α Komplexes an den MYL4-Promotor, wie sie im Falle einer Auto-Regulation zu erwarten wäre, könnte mittels eines Chip-Assays untersucht werden.

5.4 ER α und MCAD interagieren im humanen Myokard

In der vorliegenden Arbeit zeigten wir erstmals die Interaktion des humanen ER α mit MCAD im humanen Myokard. Durch Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde die Assoziation von ER α und MCAD im humanen Herzen bestätigt. Besonders im Herzen spielt MCAD als schrittgebendes Enzym der Fettsäureoxidation eine herausragende Rolle, da im Myokard die Energiegewinnung hauptsächlich durch Fettsäureverwertung gewährleistet wird.⁵⁰ Diese Daten liefern Hinweise auf eine bedeutende Rolle des ER α im Energiestoffwechsel des menschlichen Myokards.

Darüber hinaus zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit die mitochondriale Lokalisation von MCAD und stehen damit in Übereinstimmung mit weiteren Studien.^{111, 51} Wir schließen daraus, dass die Interaktion von ER α mit MCAD zumindest zum Teil entsprechend in den Mitochondrien stattfinden muss.

5.4.1 ER α interagiert mit MCAD in Mitochondrien von AC16 Zellen

In vorliegender Arbeit konnte ER α erstmalig in Mitochondrien humaner Kardiomyozyten AC 16 lokalisiert werden. Das zelluläre Expressionsmuster von ER α zeigte diesen im Nukleus und darüber hinaus auch im Zytoplasma der Kardiomyozyten. Im Zytoplasma zeigte ER α ein charakteristisches Verteilungsmuster, welches partiell mit der perlschnurartigen Aufreihung der Mitochondrien übereinstimmte (siehe Abb. 29). Diese Daten zeigen erstmals eine Fraktion des zellulären ER α in Mitochondrien humaner Kardiomyozyten.

Bisherige Arbeiten konnten ER α in uterinen und ovariellen Mitochondrien des Kaninchens, in Mitochondrien von MCF7 Zellen und C2C12 Zellen zeigen.^{112, 113, 114} Jedoch konnte ER α kürzlich in Mitochondrien neonataler Rattenkardiomyozyten lokalisiert werden.⁴⁵

Daten unserer Co-Lokalisationsstudien in AC16 Zellen konnten darüber hinaus die Interaktion von ER α mit MCAD in herzspezifischen Mitochondrien lokalisieren. Kardiale Mitochondrien als Interaktionsort für die Interaktion des ER α mit einem Protein des Fettsäurestoffwechsels wurden in einer kürzlich veröffentlichten Studie beschrieben.⁴⁵ Jazbutyte *et al.* konnten in dieser Studie in Mitochondrien der Kardiomyozyten neonataler Ratten die Interaktion des ER α mit 17β -

Hydroxysteroid Dehydrogenase zeigen, einem kurzkettigem Vertreter der Acyl-CoA Dehydrogenasen. Diese Daten stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und weisen darauf hin, dass ER α nicht nur eine bedeutende Rolle im Energiestoffwechsel der Kardiomyozyten spielt, sondern auch für die mitochondriale Funktion von Bedeutung ist, worauf in den folgenden Absätzen eingegangen werden soll.

5.4.2 Die Bedeutung des ER α für die mitochondriale Funktion

Die Lokalisation von ER α in Mitochondrien ist für verschiedene Zelllinien beschrieben.^{113, 45, 114} Wenig bekannt ist hingegen zur Bedeutung für die zellulären Reaktionen auf Östrogenstimulus.

Mitochondrien als Kraftwerke der Zelle sind besonders in Muskelzellen als Energielieferanten wichtig und machen teilweise mehr als 30% des Zellvolumens in Kardiomyozyten aus.¹¹⁵ Energie entsteht in Form von ATP durch die Verstoffwechslung von freien Fettsäuren oder Glukose, wobei die β -Fettsäureoxidation pro Molekül eine größere Anzahl ATP's liefert und die Hauptenergiequelle der adulten Kardiomyozyten darstellt. Die Herzfunktion ist im Umkehrschluss in starkem Maße abhängig von der in Mitochondrien generierten Energie.^{116, 50}

Die Wirkungen der Östrogene auf die mitochondriale Funktion ist für eine Reihe von Geweben und Zellen untersucht worden und eine Vielzahl direkter und indirekter Effekte sind beschrieben, die auf eine entscheidende Rolle des Östrogens und des ER α in Regulation und Erhalt der mitochondrialen Funktion hinweisen.^{117, 118, 119, 69} Zhai *et al.* untersuchten vitalitätsgeminderte Kardiomyozyten im Ischämie-Reperfusion-Modell in ovariectomierten Ratten und in ER α Knock-Out Mäusen. Sie beobachteten geschwollene und fragmentierte Mitochondrien in den ovariectomierten Ratten und ER α -Knock-Out Tieren, wobei die Effekte in den ovariectomierten Ratten unter Östrogensubstitution aufhebbar waren. Damit konnte eine direkte kardioprotektive Wirkung durch Erhalt der mitochondrialen Integrität demonstriert werden.^{119, 69} Auch Lagranha *et al.* konnten in einer kürzlich publizierten Studie zeigen, dass mitochondriale Proteine zur kardioprotektiven Wirkung nach Ischämie/Reperfusionsschädigung beitragen.¹²⁰

In einer Studie an ovariectomierten Ratten konnte gezeigt werden, dass Östrogenbehandlung die Fettsäureoxidation stimuliert und unter Östrogeneinfluss die Glukoseoxidation verstärkt reprimiert wird.¹²¹ Diese Daten liefern Hinweise auf eine Beteiligung des ER α an Regulation bzw. Erhalt kardialer Energieversorgung.

5.4.3 Bedeutung der MCAD im Energiestoffwechsel des humanen Myokards

MCAD als neuer Interaktionspartner für ER α ist besonders interessant, da es ein Schlüsselenzym für die β -Fettsäureoxidation in den Mitochondrien darstellt, die im Stoffwechsel des Herzmuskels den Hauptanteil zur Deckung des Energiebedarfs beiträgt.⁵⁰

Im hypertrophierten Herzen, wie auch postischämisch, kommt es zu einem Wechsel der Energiegewinnung in den Kardiomyozyten mit bevorzugter Glukoseverwertung.^{122, 123} Begleitend ist eine Herabregulation der MCAD Expression beobachtbar, die post infarctum im Myokard¹²⁴ und für druckbelastungsinduzierte Hypertrophie beschrieben wurde.^{48, 125} In einem Ratten-Modell mit Hypertension, linksventrikulärer Hypertrophie und Progression zur Herzinsuffizienz (SHHF) konnte gezeigt werden, dass die Expression von MCAD auf mRNA Ebene um bis zu 70% vermindert war. Im Gegensatz dazu war auf Proteinebene weder eine Veränderung der Enzymaktivität noch der Expression von MCAD beobachtbar. Diese blieben bis zum Eintreten der Herzinsuffizienz konstant.¹²⁶ Dies deutet darauf hin, dass die erhaltene Enzymaktivität von MCAD auf anderen, translationalen oder post-translationalen Veränderungen im hypertrophierten Herzmuskel beruhen muss. Daraus lässt sich schließen, dass durch erhöhte Stabilität bzw. Verfügbarkeit von MCAD eine effizientere Energieausbeute im Myokard erreicht werden kann.

5.5 Bedeutung der Interaktion von ER α und MCAD

Vor diesem Hintergrund stellt die Interaktion von ER α und MCAD einen denkbaren Mechanismus zur Konservierung der kardialen Energieversorgung dar, die im hypertrophierten Herzen sowie im ischämisch geschädigten Myokard gestört ist. Durch erhöhte Stabilität oder Verfügbarkeit von MCAD kann eine ATP-effiziente Energiegewinnung durch Fettsäureoxidation im Myokard erreicht werden. Die Vermutung, dass die Interaktion mit ER α Funktion oder Regulation des schrittgebenden Enzyms der Fettsäureverwertung beeinflusst, liegt hier nahe. Dazu lassen sich mit vorliegenden Daten folgende Hypothesen anführen:

Die Interaktion von ER α mit MCAD in Mitochondrien könnte der Stabilisierung des MCAD-Proteins und damit dem Erhalt der Enzymfunktion dienen. Dieser Vorgang ist besonders im hypertrophierten Myokard von Bedeutung, in welchem die Interaktion mit ER α dazu beitragen könnte, die verminderten MCAD mRNA Level zu kompensieren und die Fettsäureverwertung zur effizienten Energiegewinnung im Myokard aufrecht zu erhalten.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus wäre ein im Komplex mit ER α erleichterter Transport durch die Mitochondrienmembran. Die Interaktion mit ER α könnte dabei den Transfer von MCAD aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien als Wirkungsort befördern und auf diesem Wege die Energiegewinnung des Myokards verbessern.

Folgende weiterführende Untersuchungen könnten hierzu Antworten liefern: Mitochondrien als Interaktionsort für die Interaktion zwischen ER α und MCAD konnten bisher nur durch Immunfluoreszenzanalysen in Zellkultur gezeigt werden. In einem nächsten Schritt sollte diese durch gezielte Isolation der mitochondrialen Proteinfraction mittels Co-Immunopräzipitationsverfahren oder GST Pull down spezifisch in Mitochondrien nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass ER α tatsächlich an der Stabilisierung von MCAD beteiligt ist, ließe sich durch quantitative Western Blot Analysen von MCAD-mRNA versus MCAD-Protein an Kardiomyozyten unter Hypertrophie-Induktion und selektiver 17 β -Östradiol Stimulation untersuchen.

5.6 Hypothetisches Modell zur Interaktion des ER α mit MCAD und MYL4

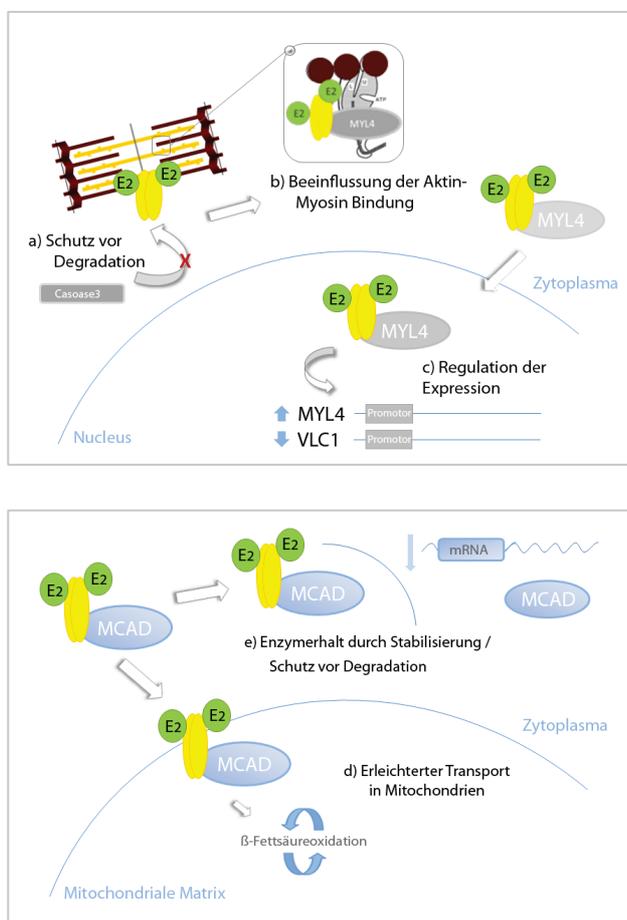


Abbildung 35: Hypothesenmodell

Das gegenwärtige Verständnis der molekularen Grundlagen der Östrogenwirkung im Herz-Kreislauf System ist noch sehr begrenzt. Die Komplexität und Vielfalt der Interaktionen des ER α stellt die Forschung diesbezüglich vor große Herausforderungen. Die Identifikation von MCAD und MYL4 als neue Interaktionspartner des ER α sowie die Lokalisation dieser Interaktionen im humanen Myokard bilden einen weiteren wichtigen Schritt zur Aufklärung der zugrundeliegenden physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen, deren Kenntnis in Zukunft helfen könnte, neue therapeutische Strategien gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu entwickeln.

6 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die Hauptursache für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Klinische Daten weisen geschlechtsabhängige Unterschiede bei Erkrankungen des Herzens aus, wobei Frauen eine zeitlich verzögerte Entwicklung und eine Konservierung der kardialen Pumpfunktion zeigen. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass Östrogen durch Vermittlung von ER α in der Pathogenese von Herzerkrankungen eine Rolle spielt. In dieser Arbeit konnten MCAD und MYL4 als neue Interaktionspartner des ER α im humanen Herzen identifiziert werden.

Die östrogenabhängige Interaktion zwischen ER α und MCAD konnte mittels „Yeast-Two-Hybrid“ nachgewiesen werden. Die Interaktion war von der Anwesenheit eines vollständigen ER α abhängig. Ergebnisse der CoIP zeigten diese Interaktion ebenso im humanen Myokard. MCAD ist als schrittgebendes Enzym des Fettsäurestoffwechsels vor allem im Herzen von entscheidender Bedeutung für die Energieversorgung und wird im erkrankten Myokard auf mRNA- und Proteinebene reguliert. Die Interaktion mit ER α könnte durch Stabilisierung von MCAD im erkrankten Myokard den Erhalt der Energieversorgung des Herzens und somit der Integrität der kardialen Funktion gewährleisten. Die Co-Lokalisation von ER α und MCAD wurde im Zytoplasma von AC16 Zellen gezeigt. Unsere Daten identifizierten die zytoplasmatischen Kompartimente, in denen ER α und MCAD interagieren, als Mitochondrien. Die Expression von ER α in Mitochondrien einer humanen Kardiomyozytenzelllinie konnte in diesem Zusammenhang erstmalig gezeigt werden.

MYL4 als Teil des Myosin Motorproteins, dessen Expression einen ausgeprägten Einfluss auf die kontraktile Eigenschaften des Myokards hat, konnte als Interaktionspartner des ER α mittels „Yeast-Two-Hybrid“ bestätigt werden. Die Interaktion mit ER α konnte zudem im menschlichen Myokard nachgewiesen werden. Co-Lokalisationsexperimente konnten die Interaktion innerhalb der H-Banden der Sarkomere der Kardiomyozyten lokalisieren. Verstärkte Signale für MYL4 im Nukleus von AC16 Zellen nach Östrogenstimulation ergaben Hinweise auf eine Expressionsregulation der MYL4. Die Identifikation der involvierten Domänen beider Interaktionspartner wies für den ER α die C-terminale EF Region als entscheidenden Bereich aus, der isoliert zu einer Interaktion mit der atrialen MYL4 befähigt war. Für MYL4 wiesen die Daten den N-terminalen Bereich des Proteins, der für die kontraktilitätsmodulierenden Eigenschaften der MYL4 verantwortlich ist, als Ort der Interaktion aus. Diese Interaktion könnte einen Mechanismus auf mole-

kularer Ebene darstellen, über welchen Östrogen zu einer Kompensation der funktionellen Einschränkung des hypertrophierten Myokards beiträgt.

Mit vorliegender Arbeit wurden durch die Untersuchung neuer Interaktionspartner des ER α im humanen Myokard neue Erkenntnisse zu herzspezifischen Hormonwirkungen erzielt, aus welchen sich in Zukunft neue therapeutische Ansätze für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ableiten lassen.

7 Literatur

1. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 ancels keys lecture. *Circulation*. 1997;95:252-264
2. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the framingham population. *Am Heart J*. 1986;111:383-390
3. Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: The framingham study. *Ann Intern Med*. 1976;85:447-452
4. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002;346:340-352
5. Brodie A, Inkster S, Yue W. Aromatase expression in the human male. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;178:23-28
6. Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, Davis S. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:184-188
7. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Vetter H. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: Role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol*. 1998;156:R1-7
8. Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: From concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*. 2005;5:343-357
9. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. 2005;308:1583-1587
10. Sherwin BB. Can estrogen keep you smart? Evidence from clinical studies. *J Psychiatry Neurosci*. 1999;24:315-321
11. Blaustein JD. Minireview: Neuronal steroid hormone receptors: They're not just for hormones anymore. *Endocrinology*. 2004;145:1075-1081
12. Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol*. 1994;9:619-626
13. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801-1811
14. Sanz-Gonzalez SM, Cano A, Valverde MA, Hermenegildo C, Andres V. Drug targeting of estrogen receptor signaling in the cardiovascular system: Preclinical and clinical studies. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004;2:107-122
15. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: A prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in finland. *Circulation*. 1999;99:1165-1172
16. Parker WH, Broder MS, Chang E, Feskanich D, Farquhar C, Liu Z, Shoupe D, Berek JS, Hankinson S, Manson JE. Ovarian conservation at the time of hysterectomy and long-term health outcomes in the nurses' health study. *Obstet Gynecol*. 2009;113:1027-1037
17. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288:321-333

18. van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 2001;104:1419-1423
19. Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Ertl G, Neyses L. The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-le2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2005;67:604-612
20. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X, Michael A, Haq S, Nuedling S, Grohe C, Force T, Mendelsohn ME, Karas RH. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/akt signaling. *Circ Res*. 2004;95:692-699
21. Booth EA, Obeid NR, Lucchesi BR. Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2039-2047
22. Thompson LP, Pinkas G, Weiner CP. Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation*. 2000;102:445-451
23. Pelzer T, de Jager T, Muck J, Stimpel M, Neyses L. Oestrogen action on the myocardium in vivo: Specific and permissive for angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Hypertens*. 2002;20:1001-1006
24. Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. Myocardial akt activation and gender: Increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res*. 2001;88:1020-1027
25. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-oh kinase. *Nature*. 2000;407:538-541
26. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: A subtle balance between er alpha and er beta. *Mol Interv*. 2003;3:281-292
27. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. 2005;19:1951-1959
28. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ers) originate from a single transcript: Studies of eralpha and erbeta expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13:307-319
29. Kim JK, Levin ER. Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nucl Recept Signal*. 2006;4:e013
30. Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2006;17:2125-2137
31. Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol*. 2002;89:12E-17E; discussion 17E-18E
32. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. A variant of estrogen receptor- α , her- α 36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9063-9068
33. Denger S, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. Tissue-specific expression of human eralpha and erbeta in the male. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;178:155-160

34. Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, Tang G, Toro L, Stefani E. Heart estrogen receptor alpha: Distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:496-510
35. Lannigan DA. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids.* 2003;68:1-9
36. Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor dna-binding domain bound to dna: How receptors discriminate between their response elements. *Cell.* 1993;75:567-578
37. Norris JD, Fan D, Kerner SA, McDonnell DP. Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 1997;11:747-754
38. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* 1987;51:941-951
39. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P, Weiske J, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *Faseb J.* 2006;20:926-934
40. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* 1997;416:107-112
41. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J, Bethke N, Zurbrugg HR, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation.* 2004;110:3270-3275
42. Schlegel A, Wang C, Pestell RG, Lisanti MP. Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J.* 2001;359:203-210
43. Barletta F, Wong CW, McNally C, Komm BS, Katzenellenbogen B, Cheskis BJ. Characterization of the interactions of estrogen receptor and mmar in the activation of csrc. *Mol Endocrinol.* 2004;18:1096-1108
44. Brann DW, Zhang QG, Wang RM, Mahesh VB, Vadlamudi RK. Pelp1-a novel estrogen receptor-interacting protein. *Mol Cell Endocrinol.* 2008
45. Jazbutyte V, Kehl F, Neyses L, Pelzer T. Estrogen receptor alpha interacts with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384:450-454
46. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S. Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279:40255-40258
47. Chung TH, Wang SM, Liang JY, Yang SH, Wu JC. The interaction of estrogen receptor alpha and caveolin-3 regulates connexin43 phosphorylation in metabolic inhibition-treated rat cardiomyocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:2323-2333
48. Barger PM, Kelly DP. Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: Molecular regulatory mechanisms. *Am J Med Sci.* 1999;318:36-42
49. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res.* 2004;95:568-578
50. Taegtmeier H. Energy metabolism of the heart: From basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol.* 1994;19:59-113
51. Ikeda Y, Keese SM, Fenton WA, Tanaka K. Biosynthesis of four rat liver mitochondrial acyl-coa dehydrogenases: In vitro synthesis, import into mitochondria, and processing of

- their precursors in a cell-free system and in cultured cells. *Arch Biochem Biophys.* 1987;252:662-674
52. Kelly DP, Kim JJ, Billadello JJ, Hainline BE, Chu TW, Strauss AW. Nucleotide sequence of medium-chain acyl-coa dehydrogenase mRNA and its expression in enzyme-deficient human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:4068-4072
53. Matsubara Y, Kraus JP, Ozasa H, Glassberg R, Finocchiaro G, Ikeda Y, Mole J, Rosenberg LE, Tanaka K. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the entire precursor of rat liver medium chain acyl coenzyme a dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1987;262:10104-10108
54. Rüdell R, Brinkmeier H. Muskelphysiologie. In: Schaible FSuHG, ed. *Neuro- und sinnesphysiologie.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2006:66.
55. Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science.* 1993;261:58-65
56. Kurabayashi M, Komuro I, Tsuchimochi H, Takaku F, Yazaki Y. Molecular cloning and characterization of human atrial and ventricular myosin alkali light chain cDNA clones. *J Biol Chem.* 1988;263:13930-13936
57. Aydt EM, Wolff G, Morano I. Molecular modeling of the myosin-s1(a1) isoform. *J Struct Biol.* 2007;159:158-163
58. Auckland LM, Lambert SJ, Cummins P. Cardiac myosin light and heavy chain isotypes in tetralogy of fallot. *Cardiovasc Res.* 1986;20:828-836
59. Cummins P, Lambert SJ. Myosin transitions in the bovine and human heart. A developmental and anatomical study of heavy and light chain subunits in the atrium and ventricle. *Circ Res.* 1986;58:846-858
60. Morano I. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med.* 1999;77:544-555
61. Hernandez OM, Jones M, Guzman G, Szczesna-Cordary D. Myosin essential light chain in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1643-1654
62. Ritter O, Luther HP, Haase H, Baltas LG, Baumann G, Schulte HD, Morano I. Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Mol Med.* 1999;77:677-685
63. Morano I, Hadicke K, Haase H, Böhm M, Erdmann E, Schaub MC. Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:1177-1187
64. Morano I, Haase H. Different actin affinities of human cardiac essential myosin light chain isoforms. *FEBS Lett.* 1997;408:71-74
65. Cummins P. Transitions in human atrial and ventricular myosin light-chain isoenzymes in response to cardiac-pressure-overload-induced hypertrophy. *Biochem J.* 1982;205:195-204
66. Sutsch G, Brunner UT, von Schulthess C, Hirzel HO, Hess OM, Turina M, Krayenbuehl HP, Schaub MC. Hemodynamic performance and myosin light chain-1 expression of the hypertrophied left ventricle in aortic valve disease before and after valve replacement. *Circ Res.* 1992;70:1035-1043

67. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L, Hirano M, Isaac ND. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:133-147
68. Lizotte E, Grandy SA, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cell Physiol Biochem.* 2009;23:75-86
69. Zhai P, Eurell TE, Cooke PS, Lubahn DB, Gross DR. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1640-1647
70. Wang M, Crisostomo P, Wairiuko GM, Meldrum DR. Estrogen receptor-alpha mediates acute myocardial protection in females. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H2204-2209
71. Regitz-Zagrosek V, Brokat S, Tschope C. Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49:241-251
72. Vitale C, Mendelsohn ME, Rosano GM. Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:532-542
73. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 2000;65:227-251
74. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19:833-842
75. Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW. The 26s proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell.* 2000;5:939-948
76. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol.* 1996;3:206
77. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4338s-4342s; discussion 4411s-4412s
78. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 1997;387:733-736
79. Stenoien DL, Mancini MG, Patel K, Allegretto EA, Smith CL, Mancini MA. Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol.* 2000;14:518-534
80. Vadlamudi RK, Wang RA, Mazumdar A, Kim Y, Shin J, Sahin A, Kumar R. Molecular cloning and characterization of pelp1, a novel human coregulator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 2001;276:38272-38279
81. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* 1995;80:237-248
82. Lowey S, Saraswat LD, Liu H, Volkmann N, Hanein D. Evidence for an interaction between the sh3 domain and the n-terminal extension of the essential light chain in class ii myosins. *J Mol Biol.* 2007;371:902-913
83. Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase c. *Nature.* 1988;332:272-275

84. Ravi Chandra B, Gowthaman R, Raj Akhouri R, Gupta D, Sharma A. Distribution of proline-rich (pxxxp) motifs in distinct proteomes: Functional and therapeutic implications for malaria and tuberculosis. *Protein Eng Des Sel*. 2004;17:175-182
85. Morano M, Boels P, Haworth SG, Haase H, Morano I. Expression and function of atrial myosin light chain 1 in the porcine right ventricle of normal and pulmonary hypertensive animals. *Adv Exp Med Biol*. 1998;453:481-488; discussion 488-489
86. Hirzel HO, Tuchschnid CR, Schneider J, Kraysenbuehl HP, Schaub MC. Relationship between myosin isoenzyme composition, hemodynamics, and myocardial structure in various forms of human cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 1985;57:729-740
87. Abdelaziz AI, Segaric J, Bartsch H, Petzhold D, Schlegel WP, Kott M, Seefeldt I, Klose J, Bader M, Haase H, Morano I. Functional characterization of the human atrial essential myosin light chain (halc-1) in a transgenic rat model. *J Mol Med*. 2004;82:265-274
88. Schaub MC, Hefti MA, Zuellig RA, Morano I. Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res*. 1998;37:381-404
89. Timson DJ, Trayer HR, Trayer IP. The n-terminus of a1-type myosin essential light chains binds actin and modulates myosin motor function. *Eur J Biochem*. 1998;255:654-662
90. Haase H, Dobbernack G, Tunnemann G, Karczewski P, Cardoso C, Petzhold D, Schlegel WP, Lutter S, Pierschalek P, Behlke J, Morano I. Minigenes encoding n-terminal domains of human cardiac myosin light chain-1 improve heart function of transgenic rats. *Faseb J*. 2006;20:865-873
91. Glenmark B, Nilsson M, Gao H, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K, Westerblad H. Difference in skeletal muscle function in males vs. Females: Role of estrogen receptor-beta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287:E1125-1131
92. Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Lehmkuhl HB. [heart failure--are there gender aspects?]. *Internist (Berl)*. 2008;49:422-426, 428
93. Moran AL, Nelson SA, Landisch RM, Warren GL, Lowe DA. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol*. 2007;102:1387-1393
94. Brown M, Ning J, Ferreira JA, Bogener JL, Lubahn DB. Estrogen receptor-alpha and -beta and aromatase knockout effects on lower limb muscle mass and contractile function in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E854-861
95. Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, Grohe C. 17 beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible no synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res*. 1999;43:666-674
96. Kalbe C, Mau M, Wollenhaupt K, Rehfeldt C. Evidence for estrogen receptor alpha and beta expression in skeletal muscle of pigs. *Histochem Cell Biol*. 2007;127:95-107
97. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000;45:273-278
98. Fewell JG, Hewett TE, Sanbe A, Klevitsky R, Hayes E, Warshaw D, Maughan D, Robbins J. Functional significance of cardiac myosin essential light chain isoform switching in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1998;101:2630-2639
99. Morano M, Zacharzowski U, Maier M, Lange PE, Alexi-Meskishvili V, Haase H, Morano I. Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms. *J Clin Invest*. 1996;98:467-473

100. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997;336:1131-1141
101. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-776
102. Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, Gillitzer A, Pinkernell K, Ott T, Pragst I, Stadele C, Seyfarth M, Schomig A, Ungerer M. Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Hum Gene Ther.* 2001;12:2051-2063
103. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8144-8149
104. Zacharzowsky UB, Wolff G, Kott M, Haase H, Bartsch H, Nuessler AK, Baltas LG, Karawajew L, Morano I. Analysis of the energetic state of heart cells after adenovirus-mediated expression of halc-1. *J Cell Biochem.* 2002;86:422-431
105. Abdelaziz AI, Pagel I, Schlegel WP, Kott M, Monti J, Haase H, Morano I. Human atrial myosin light chain 1 expression attenuates heart failure. *Adv Exp Med Biol.* 2005;565:283-292; discussion 292, 405-215
106. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:6252-6256
107. Moretti A, Weig HJ, Ott T, Seyfarth M, Holthoff HP, Grewe D, Gillitzer A, Bott-Flugel L, Schomig A, Ungerer M, Laugwitz KL. Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11860-11865
108. van Eickels M, Patten RD, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Gostyla K, Celestin F, Grohe C, Mendelsohn ME, Karas RH. 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:2084-2092
109. Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM, Zukin RS. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal ca1. *J Neurosci.* 2002;22:2115-2124
110. Rau SW, Dubal DB, Bottner M, Gerhold LM, Wise PM. Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. *J Neurosci.* 2003;23:11420-11426
111. Thorpe C, Kim JJ. Structure and mechanism of action of the acyl-coa dehydrogenases. *Faseb J.* 1995;9:718-725
112. Monje P, Zanello S, Holick M, Boland R. Differential cellular localization of estrogen receptor alpha in uterine and mammary cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;181:117-129
113. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. Mitochondrial localization of estrogen receptor alpha and beta in human mcf7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286:E1011-1022
114. Milanesi L, Russo de Boland A, Boland R. Expression and localization of estrogen receptor alpha in the c2c12 murine skeletal muscle cell line. *J Cell Biochem.* 2008;104:1254-1273
115. Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech.* 1994;27:198-219
116. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ. [the mitochondrial organelle and the heart]. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55:1293-1310

117. Klinge CM. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem.* 2008;105:1342-1351
118. Simpkins JW, Yang SH, Sarkar SN, Pearce V. Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;290:51-59
119. Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR. Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2766-2775
120. Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 2010;106:1681-1691
121. Hatta H, Atomi Y, Shinohara S, Yamamoto Y, Yamada S. The effects of ovarian hormones on glucose and fatty acid oxidation during exercise in female ovariectomized rats. *Horm Metab Res.* 1988;20:609-611
122. Nohara R. Lipid metabolism in the heart--contribution of bmipp to the diseased heart. *Ann Nucl Med.* 2001;15:403-409
123. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:45-79
124. Remondino A, Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Tardy I, Papageorgiou I, Dorsaz PA, Jorge-Costa M, Lerch R. Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2025-2034
125. Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation.* 1996;94:2837-2842
126. Sack MN, Kelly DP. The energy substrate switch during development of heart failure: Gene regulatory mechanisms (review). *Int J Mol Med.* 1998;1:17-24

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Regitz-Zagrosek für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ihre intensive Betreuung und ihre Unterstützung meiner Arbeit werden mir unvergesslich bleiben. Für die umfassenden Einblicke in die molekulare Grundlagenforschung im Rahmen des DFG- Graduiertenkollegs bin ich Frau Prof. Dr. med. Regitz-Zagrosek sehr dankbar.

Bei Dr. Shokufeh Mahmoodzadeh möchte ich mich von ganzem Herzen für die engagierte Betreuung im Labor bedanken. Ihr Fachwissen, ihre geduldige Bereitschaft für ungezählte Diskussionen, ihre herzliche Unterstützung bei Problemen und ihr klarer Blick waren mir während dieser Arbeit wertvolle Begleiter.

Mein Dank geht ganz besonders an Hang Pham für die großartige Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken, an Elke Dworatzek für großzügige Hilfsbereitschaft sowie an Stephan Fritschka. Ich danke allen für die entspannte und kreative Zusammenarbeit, moralische Unterstützung und eine unvergessliche Zeit.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Ingo Morano, der mit seiner Begeisterung und anregenden Diskussionen diese Arbeit inspirierte.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich Jörg Rösner für hervorragende technische Unterstützung sowie Arne Kühne und Anja Angelov im Labor von Prof. Regitz-Zagrosek für ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft aussprechen. Danken möchte ich auch bei Hugo Sanchez, Joachim Leber, Eva Becher, Daniela Fliegner, Georgious Kararigas und allen weiteren Mitarbeitern für das angenehme Miteinander.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mich mit viel Geduld und Fürsorge begleitet und unterstützt hat. Und ganz besonders danken möchte ich Steffen Wellsandt, für seinen unermüdlichen Beistand und für seine Liebe.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ER α	3
Abbildung 2: Verteilung der Mitochondrien in Kardiomyozyten.....	6
Abbildung 3: Aufbau des Herzmuskels.	7
Abbildung 4: Aktin-Myosin-Komplex (A) 3-D-Modell der MYL4 im Aktin-Myosin Komplex. .	8
Abbildung 5: Modell des Prinzips der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode.	29
Abbildung 6: Restriktionsanalyse der MYL4 Fragmente AS 1-39, AS 1-55 und AS 40-197.....	31
Abbildung 7: Funktionsprinzip der CoIP.....	36
Abbildung 8: Restriktionsanalyse der TOPO 4-MCAD Kolonien.....	42
Abbildung 9: Restriktionsanalyse der pACT2.2 MCAD Fusionskonstrukte.....	42
Abbildung 10: ER α interagiert mit MCAD im „Yeast-Two-Hybrid“-Versuch.....	44
Abbildung 11: Interaktion von ER α und MYL4.....	45
Abbildung 12: ER α -FL und ER α -EF interagieren mit MYL4.....	46
Abbildung 13: Interaktion von ER α mit N-terminalerMYL4.....	47
Abbildung 14: Zusammenfassung der Interaktionen von ER α mit MYL4 bzw. MCAD und involvierten Domänen.....	49
Abbildung 15: Interaktionen von MYL4 und MCAD mit ER α im β -Galaktosidase Assay.....	50
Abbildung 16: Western Blot Analyse der MCAD Expression.....	51
Abbildung 17: Western Blot Analyse der MYL4 Expression in humanem Atrium.....	52
Abbildung 18: Western Blot Analyse der ER α Expression im humanen Herzen.....	53
Abbildung 19: ER α und MCAD interagieren im humanen Myokard.....	54
Abbildung 20: MYL4 und ER α interagieren im humanen Atrium.....	55
Abbildung 21: Lokalisation von MCAD im humanen Myokard.....	56
Abbildung 22: MCAD und ER α interagieren im humanen Myokard.....	57
Abbildung 23: Lokalisation von MYL4 in humanen Atrium.....	58

Abbildung 24: Lokalisation der MYL4 innerhalb der Sarkomerstruktur.	59
Abbildung 25: Co-Lokalisation von ER α und MYL4 im humanen Atrium.	60
Abbildung 26: Lokalisation von MCAD in AC16 Zellen in Abhängigkeit von 17 β -Östradiol. ...	62
Abbildung 27: Lokalisation von ER α in AC16 Zellen in Abhängigkeit von 17 β -Östradiol.	63
Abbildung 28: MCAD-Antikörper identifiziert Mitochondrien.	64
Abbildung 29: Mitochondriale Fraktion des ER α	65
Abbildung 30: Co-Lokalisation von ER α and MCAD in AC16 Zellen.	66
Abbildung 31: Co-Lokalisation von MYL4 und ER α in AC16 Zellen.	68
Abbildung 32: PxxP-Motiv im N-Terminalen Bereich der MYL4.	74
Abbildung 33: Interaktion der N-terminalen MYL4 mit dem Aktin-Myosin-Komplex.	76
Abbildung 34: Schematisches Modell der Interaktion von ER α und MYL4. ER α (rot) und MYL4 (grün) interagieren im Bereich der H-Bande des Sarkomers.	78
Abbildung 35: Hypothesenmodell	86

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	11
Tabelle 3: Molekularbiologische Kits	12
Tabelle 4: Enzyme	13
Tabelle 5: Primäre Antikörper	13
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper	13
Tabelle 7: Bakterienstämme	14
Tabelle 8: Nährmedien für Bakterien	14
Tabelle 9: Hefestamm	15
Tabelle 10: Medien und Zusätze für Hefen	15
Tabelle 11: Antibiotika	16
Tabelle 12: Stammlösungen	16
Tabelle 13: Zelllinie	17

Anhang

Tabelle 14: Zusätze für Zellkultur.....	17
Tabelle 15: Medien für Zellkultur.....	17
Tabelle 16: Klonierungsvektoren.....	18
Tabelle 17: Rekombinante Zwischenklonierungsvektoren.....	18
Tabelle 18: „Yeast Two Hybrid“ Vektoren.....	19
Tabelle 19: Rekombinante „Yeast Two Hybrid“ Vektoren.....	20
Tabelle 20: Primer für PCR-Reaktion.....	21
Tabelle 21: Primer für die Sequenzierung.....	21
Tabelle 22: Software.....	22
Tabelle 23: PCR-Ansatz.....	27
Tabelle 24: PCR-Programm.....	27
Tabelle 25: Antikörper für die Immunodetektion.....	35

10 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Miriam A. Schanz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Die Identifikation und Charakterisierung von Myosin Light Chain 4 und Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase als neuartige Interaktionspartner des Östrogenrezeptor alpha‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

27.März 2012

11 Lebenslauf

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

Veröffentlichungen:

S. Mahmoodzadeh, M. Schanz, H. Pham, , M.M. Davidson, I. Morano, V. Regitz-Zagrosek

Identification and characterization of Myosin Light Chain-4 as novel cellular interaction partner of ER α in the human myocardium

J Muscle Res Cell Motil (2011) 32: 327-373

Kongressbeiträge:

Vorträge:

M. Schanz, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Identification and Characterization of MYL4 and MCAD as novel Interaction Partners of Estrogen Receptor alpha in the Human Myocardium

3rd Day of Science on the Molecular Basis of CVD (Joint Meeting of GK 754III and Cardiovasc)
Berlin, 28.11.2008

Poster:

Miriam Schanz, Shokufeh Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Identification and Characterization of MYL4 and MCAD as novel Interaction Partners of Estrogen Receptor alpha in the Human Myocardium

3rd Day of Science on the Molecular Basis of CVD (Joint Meeting of GK 754III and Cardiovasc)
Berlin, 28.11.2008

Hang Pham, **Miriam Schanz**, Shokufeh Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Identification and functional analysis of novel interaction partners of estrogen receptor α in the human heart

Institute of Gender Medicine (GiM) Evaluation, Berlin, 29. April. 2009