

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und
Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité–Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Östrogen auf den Akt/mTOR– und Erk–Signalweg
bei adaptiver Herzhypertrophie in vitro

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Utta Schmidt
aus Plauen

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
1.1. Klinische Bedeutung der Herzmuskelhypertrophie	3
1.1.1. Epidemiologie	3
1.1.2. Pathomechanismus der Herzmuskelhypertrophie	3
1.1.3. Formen der Herzmuskelhypertrophie	4
1.1.4. Geschlechtsspezifische Unterschiede	5
1.2. Hypertrophe Signaltransduktionswege in Kardiomyozyten	6
1.2.1. Hypertrophe Stimuli	6
1.2.2. Der MAPK–Signalweg	8
1.2.3. Der Akt/mTor–Signalweg	9
1.3. Der Einfluss von Östrogen (E2) auf die Herzmuskelhypertrophie	14
1.3.1. E2 und seine Rezeptoren	14
1.3.2. Kardiale Effekte von E2	16
2. Fragestellung	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Material	19
3.1.1. Geräte	19
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	20

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien	21
3.1.4. Kits	22
3.1.5. Pufferrezepte	23
3.1.6. Medien	25
3.1.7. Polyacrylamid–Gel–Rezepte	27
3.1.8. Antikörper	27
3.2. Methoden	29
3.2.1. Zellkultur	29
3.2.1.1. Zelllinie	29
3.2.1.2. Beschichten von Zellkulturbehältnissen	29
3.2.1.3. Auftauen von Zellen	29
3.2.1.4. Zellpassage	30
3.2.1.5. Einfrieren von Zellen	30
3.2.1.6. Zellstimulation	31
3.2.2. Proteindetektion mittels Westernblot	34
3.2.2.1. Zellyse und Proteinbestimmung	34
3.2.2.2. SDS–PAGE	35
3.2.2.3. Westernblot	35
3.2.2.4. Blockierung unspezifischer Bindungen und Antikörperinkubation	35
3.2.2.5. Immunologische Proteindetektion	36
3.2.2.6. Stripping	36
3.2.3. Durchflusszytometrie (FACS)	37
3.2.4. Immunfluoreszenzmikroskopie	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Nicht–genomische Effekte von E2	39
4.1.1. E2–Konzentrationsfindung	39
4.1.2. Zeitabhängige Aktivierung und Deaktivierung von intrazellulären Signal molekülen durch E2–induzierte Phosphorylierung	40
4.1.2.1. Erk–Aktivierung	40
4.1.2.2. MTORC2–/ Akt–Aktivierung	41
4.1.2.3. GSK3 α/β –Deaktivierung	41

4.1.2.4. TSC2–Deaktivierung _____	42
4.1.2.5. MTORC1– /p70S6K–Aktivierung _____	43
4.1.3. Abhängigkeit der E2–vermittelten Aktivierung des Erk– und Akt/mTor– Signalweges von den Östrogenrezeptoren (ER) _____	44
4.1.3.1. Effekte unterschiedlicher Konzentrationen des ER–Inhibitors ICI182,780 auf die Akt–Phosphorylierung _____	45
4.1.3.2. Zeitabhängige Effekte von 10 µM ICI182,780 auf die E2–vermittelte Aktivierung des Erk– und Akt/mTor–Signalweges _____	46
4.2. Modulation des Akt/mTor–Signalweges durch E2 bei adaptiver Langzeitstimulation mit IGF–1 _____	51
4.2.1. Regulation des Akt/mTOR–Signalweges durch E2 bei adaptiver Langzeitstimulation mit IGF–1 und Rolle der Erk–Kinase _____	51
4.2.1.1. Konzentrationsfindung für PD184352 zur effektiven Inhibition von Erk ____	52
4.2.1.2. Effekte von 1 µM PD184352 auf ausgewählte Kinasen des Erk– und Akt/mTor–Signalweges _____	53
4.2.2. Modulation des Akt/mTor–Signalweges durch E2 bei adaptiver Langzeitstimulation mit IGF–1 und Auswirkung auf die Zellgröße _____	58
4.2.3. Rolle der Erk–Aktivierung bei der Vermittlung adaptiv–hypertropher Effekte _	59
5. Diskussion _____	61
5.1. Zellkulturmodell und verwendete Medien und Lösungsmittel _____	61
5.2. Aktivierung der Erk– und Akt/mTor–Signalwege bei Kurzzeitstimulation mit E2 _____	64
5.3. Rolle der ER bei der E2–induzierten Aktivierung der Erk– und Akt/mTor–Signalwege _____	68
5.4. Regulation von mTORC1 durch E2 unter Langzeitstimulation mit IGF–1 _____	70

5.5. Regulation von mTORC2 durch E2 unter Langzeitstimulation mit IGF-1	72
5.6. Effekte von E2 auf die zelluläre Hypertrophie	73
5.7. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick	75
6. Literaturverzeichnis	77
Eidesstattliche Versicherung	92
Lebenslauf	93
Publikationen	94
Danksagung	95

Abkürzungsverzeichnis

α/β -MHC	α/β schwere Myosinkette
ANP	atriales natriuretisches Protein
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
ASK-1	Apoptose stimulierte Kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
β -GP	β -Glycerophosphat
BCL	B-Zelllymphom
BNP	natriuretisches Protein des Gehirns
BSA	bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
CCC	supplementiertes Claycombmedium
cm	Zentimeter (10^{-2})
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
c-Src	zelluläres Sarkom
CT-1	Cardiotrophin 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D _C	Detergenz kompatibel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
4EBP1	eIF4E-bindendes Protein 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eeF	eukaryoter Elongationsfaktor
eIF	eukaryoter Initiationsfaktor
Erk	extrazellulär signalregulierte Kinase
ET-1	Endothelin-1
E2	17 β -Östradiol
ER	Östrogenrezeptor
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FKS	fetales Kälberserum

FN	Fibronektin
g	Fallbeschleunigung
GnRH	Gonadotropinfreisetzendes Hormon
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
gp130	Glykoprotein 130
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
ICI	(7R,9S,13S,14S,17S)-7-(9-(4,4,5,5,5-Pentafluoropentylsilyl)nonyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-13-methyl-6H-cyclopentaphenanthren-3,17-diol
IGF-1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IL	Interleukin
ILK-1	integrinverbundene Kinase 1
IP3	Inositol-3-phosphat
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Kontrolle
kDa	kiloDalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
µl	Mykroliter (10^{-6})
MAPK(KK)	mitogenaktivierte Proteinkinase (Kinase Kinase)
MCIP-1	modulierendes, calcineurininteragierendes Protein 1
MEF-2	myozytverstärkender Faktor 2
mg	Milligramm (10^{-3})
min	Minute
ml	Milliliter
MLK-3	leichte Myosinkettenkinase 3
mTor	Angriffsziel von Rapamycin bei Säugetieren
mTORC	mTor-Komplex
N	Stickstoff

NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₄ P ₂ O ₇	Natriumpyrophosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
nm	Nanometer (10 ⁻⁹)
p	phosphoryliert
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD	2-(2-Chloro-4-iodo-phenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluoro-benzamid
PDK	PI3K-abhängige Kinase
PH	Pleckstrin Homologie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PK(A/B/C)	Proteinkinase (A/B/C)
PRAS40	Prolinreiches Aktsubstrat 40
p70S6K	ribosomales ProteinS6-Kinase
Q	L-Glutamin
Raptor	regulationsassoziiertes Protein von mTor
Rheb	Ras-Homolog angereichert im Gehirn
Rictor	Rapamycininsensitiver Companion von mTor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin
SERCA	Sarkoplasmatisch- / Endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase
SERM	selektiver Östrogenrezeptormodulator
STAT	Signaltransdukteur und Aktivator der Transkription

TAK-1	TGF β -aktivierte Kinase 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Thr	Threonin
TOP	terminaler Oligopyrimidintrakt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	tuberöse Sklerose Komplex
TX	Trypsin/EDTA
V	Volt
wnt	wingless Int-1
ZKF	Zellkulturflasche
ZKS	Zellkulturschale

Zusammenfassung

Neben den maladaptiven Formen der kardialen Hypertrophie gibt es auch eine adaptive Anpassung des Myokards zum Beispiel bei Sportlern oder während der Schwangerschaft, die mit einem reduzierten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen einhergeht. Geschlechtsspezifische Unterschiede rücken dabei zunehmend in den Fokus des medizinischen Interesses und auch wenn zahlreiche kardioprotektive Effekte des weiblichen Geschlechtshormons beschrieben wurden, sind neben den klassischen genomischen Effekten von 17β -Östradiol die schnellen nicht-genomischen noch relativ schlecht verstanden, scheinen aber eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Myokardhypertrophie zu spielen. Aufgrund der klinischen Bedeutung ist es daher wichtig, die Dynamik beteiligter Signaltransduktionswege zu kennen. Dabei gewinnt vor allem die Wichtigkeit des sogenannten „crosstalks“ zwischen den klassischen Signalwegen an Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde daher in kultivierten Kardiomyozyten der Einfluss von 17β -Östradiol auf den Akt/mTor- und Erk-Signalweg untersucht, zwei eng verflochtenen Signalkaskaden, die bekanntermaßen an der Herzmuskelhypertrophie beteiligt sind. Zusätzlich wurden adaptive (IGF-1) hypertrophe Bedingungen simuliert. In den Kurzzeitversuchen zeigte sich, dass 17β -Östradiol allein bereits Effekte auf die untersuchten Kinasen der beiden Signalkaskaden ausübte. Diese Effekte waren abhängig vom Vorhandensein der Östrogenrezeptoren ER α und ER β . In der adaptiv-hypertrophen Langzeitstimulation führte 17β -Östradiol zu einer Zunahme der Zellgröße. Auf Signaltransduktionsebene konnte dabei eine verstärkte Erk-abhängige mTORC1-Aktivierung, gemessen an der p70S6K-Phosphorylierung, beobachtet werden bei unveränderter Gesamtexpression der untersuchten Proteine. Darüber hinaus resultierte die Langzeitinkubation der Zellen mit 17β -Östradiol in einer Zunahme nukleär lokalisierter Akts, die vergleichbar mit der durch IGF-1 war. Die Blockade der Östrogenrezeptoren hob den Effekt auf. Insgesamt sehen wir anhand unserer Ergebnisse eine kardiale Bedeutung des weiblichen Geschlechtshormons in der koaktivierenden Regulation des Akt/mTor-Signalweges, die unter Vermittlung von Erk die adaptiv-hypertrophen Effekte auf Kardiomyozyten verstärkt und dadurch maladaptiv-hypertrophen Prozessen potentiell entgegenwirkt. Die vorliegende Arbeit hat damit klinische Implikationen unter anderem für die Therapie von Frauen mit Antiöstrogenen auf Grund eines hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms und betont die Notwendigkeit der Weiterentwicklung zellspezifischer Therapien zur Reduktion negativer kardialer Begleiterscheinungen.

Abstract

The heart responds to increased workload during pregnancy or in athletes with adaptive cardiac remodeling. This form of cardiac hypertrophy is characterized by a reduced risk for cardiovascular disease. In addition, pre-menopausal females display reduced cardiovascular morbidities implicating a specific role for female sex hormones in cardioprotection. Whereas numerous studies focus on the classical genomic effects of 17 β -estradiol, the rapid non-genomic actions are still poorly understood yet seem to play an increasing role in the pathogenesis of myocardial hypertrophy. Understanding the dynamics of the involved signaling pathways and their "cross talks" is therefore of major clinical relevance. In the present work, we applied a cell culture model of female cardiomyocytes mimicking pre- and postmenopausal conditions by presence or absence of 17 β -estradiol. Main focus was on the Akt/mTor- and Erk-signaling pathways, two closely interdependent signaling cascades that are known to be involved in cardiac hypertrophy. To simulate adaptive hypertrophic conditions IGF-1 was used. The short term tests showed that 17 β -estradiol alone already activated time-dependently both signaling cascades. These effects were dependent on the presence of estrogen receptors ER α and ER β . In the adaptive hypertrophic long term stimulation 17 β -estradiol led to a rise in cell size accompanied with increased Erk-dependent mTORC1 activation, as determined by p70S6K phosphorylation. Overall expression levels of the investigated protein kinases did not change. Long term incubation of cells with 17 β -estradiol resulted in an increase in nuclear localized Akt, which was comparable to that of IGF-1, indicating "pro-survival" actions of both, 17 β -estradiol and IGF-1. Our data highlight a specific function of the female sex hormone 17 β -estradiol in co-regulation of the Akt/mTor-signaling pathway with the adaptive stimulus IGF-1 and the specific role of Erk kinase to enhance the adaptive hypertrophic effects. These processes might contribute essentially to reduction of maladaptive hypertrophic remodeling in response to pathological stressors in female cardiomyocytes. The present work has clinical implications for example for the treatment of women with anti-estrogens due to a hormone receptor positive breast cancer and emphasizes the need to develop cell specific therapies to reduce negative cardiac side effects.

1. Einleitung

1.1. Klinische Bedeutung der Herzmuskelhypertrophie

1.1.1. Epidemiologie

2012 verstarben 349217 Menschen in Deutschland an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung ¹. Damit nimmt diese Krankheitsgruppe mit großem Abstand seit Jahrzehnten unter den Mortalitätsraten den ersten Rang ein (Abb. 1) ¹.

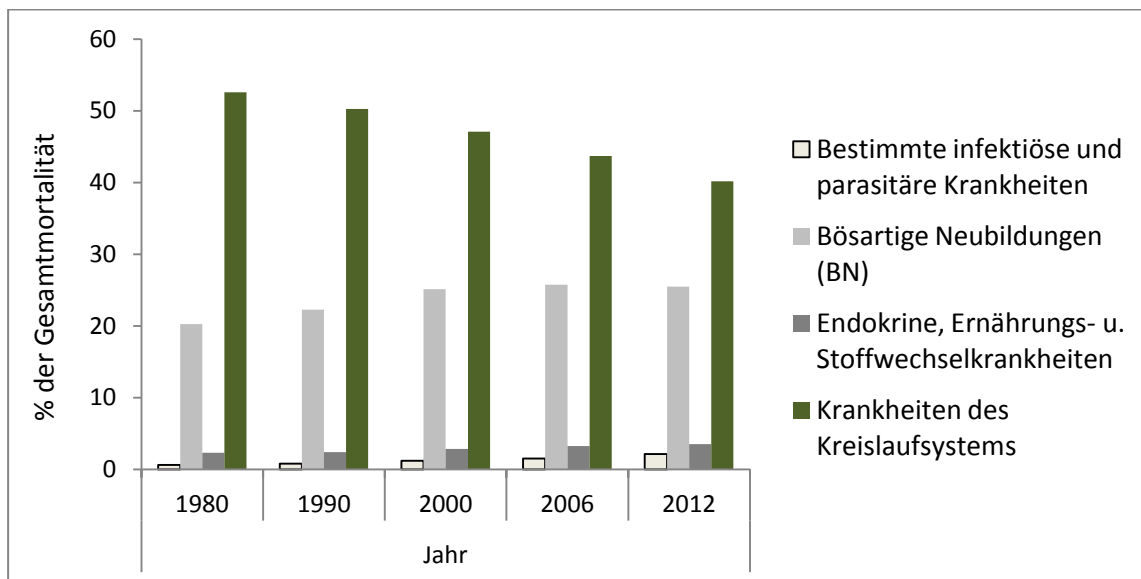


Abb. 1: Relative Mortalitätsraten ausgewählter Erkrankungen in Deutschland.

Während die Sterbezahlen für akute Myokardinfarkte rückläufig sind, nehmen die Todesfälle durch hypertensive Herzerkrankungen seit Jahren zu ¹. Zu dieser Gruppe von Erkrankungen zählt man auch die linksventrikuläre Hypertrophie, die generell einen unabhängigen Risikofaktor für Myokardinfarkt, Arrhythmie und plötzlichen Herztod darstellt ². Ein davon stark betroffenes Kollektiv sind Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die zu 70 bis 80% an einer linksventrikulären Hypertrophie leiden ³.

1.1.2. Pathomechanismus der Herzmuskelhypertrophie

Als postmitotisches Organ stellt die Größenzunahme der Kardiomyozyten die einzige Möglichkeit des Herzmuskels dar, im Rahmen einer Anpassungsreaktion bei hämodynamischer Überbelastung oder Verletzungen des Herzmuskels durch eine Normalisierung der Wandspannung die kardiale Auswurfleistung aufrecht zu erhalten ⁴. Dies lässt sich mit Hilfe des Laplace-Gesetzes veranschaulichen: $\sigma = p \cdot r / (2 \cdot h)$ ⁴. Dabei entspricht σ der Wandspannung, p dem Ventrikeldruck, r dem Innenradius des

Ventrikels und h der Wanddicke. Eine erhöhte Wandspannung σ verursacht durch einen erhöhten Ventrikeldruck p beispielsweise durch arterielle Hypertonie wird durch eine Zunahme der Wanddicke h normalisiert⁴. Dabei kommt es zunächst zur Zellhypertrophie, das heißt Zunahme sowie veränderter Anordnung der Myofibrillen und Mitochondrien der linksventrikulären Kardiomyozyten, die auf Grund der damit einhergehenden deutlichen Zunahme der Wanddicke auch als konzentrische Hypertrophie bezeichnet wird⁵. Man nimmt an, dass durch die dauerhafte Aktivierung hypertropher Signaltransduktionswege der Prozess allerdings dekompenziert: Es kommt zur Degeneration und schließlich zum Zelltod von Kardiomyozyten⁴. Darüber hinaus kommt nach der „ischemic core“-Hypothese auch der verschlechterten Sauerstoffversorgung hypertrophierter Kardiomyozyten eine Bedeutung für den Zelluntergang zu⁶. Neben der Nekrose spielen des Weiteren Apoptose und Autophagie eine Rolle⁷. Die untergegangenen Kardiomyozyten werden von Fibroblasten und Adipozyten durch Kollagen und Fett ersetzt, es kommt zur kardialen Fibrosierung mit allen negativen Konsequenzen wie zum Beispiel Ventrikeldilatation und Reduktion der Pumpleistung⁸. Bei anhaltender kardialer Belastung entwickelt sich also ein *circulus vitiosus*, der über eine maladaptive Hypertrophie letztlich in eine Herzinsuffizienz mit sehr ungünstiger Prognose münden kann^{4,9}.

1.1.3. Formen der Herzmuskelhypertrophie

Neben der oben erwähnten konzentrischen Hypertrophie als kardiale Reaktion auf eine chronische Druckbelastung existiert als eine weitere Form die exzentrische Hypertrophie. Dabei kommt es durch eine erhöhte Volumenbelastung des Herzmuskels beispielsweise auf Grund von Herzklappenvitien oder nach Myokardinfarkt zu einer Ventrikeldilatation bei nur gering ausgeprägter Wanddickenzunahme¹⁰. Außer diesen pathologischen oder maladaptiven Formen der kardialen Hypertrophie gibt es jedoch auch eine physiologische bzw. adaptive Anpassung des Myokards, die man zum Beispiel bei Sportlern oder während der Schwangerschaft findet und die unter anderem durch einen erniedrigten Ruhepuls gekennzeichnet ist (Abb. 2)¹⁰⁻¹¹. Dieses so genannte „Athletenherz“ geht mit einem reduzierten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen einher¹¹.

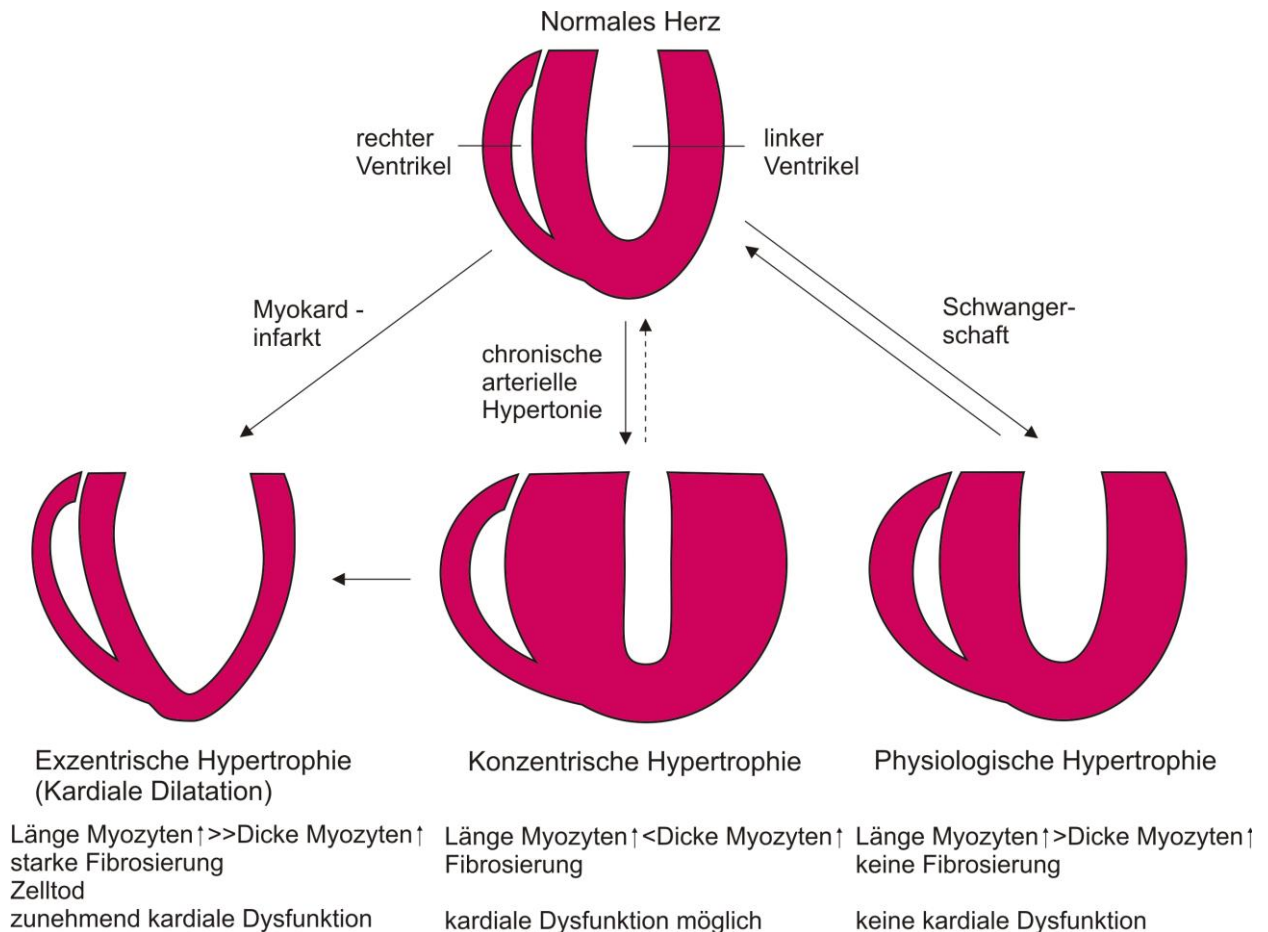


Abb. 2: Formen der Herzmuskelhypertrophie: Links und Mitte unten maladaptive, rechts unten adaptive Hypertrophie (modifiziert nach Heineke et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2006).

1.1.4. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Es ist bekannt, dass sich sowohl die Ätiologie als auch die Pathophysiologie der Herzmuskelhypertrophie bei Männern und Frauen unterscheidet: Frauen entwickeln typischer Weise eine konzentrische Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion bei guter systolischer Pumpfunktion als Folge von arterieller Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus¹². Im Gegensatz dazu findet man bei Männern häufiger eine exzentrische Hypertrophie mit systolischem Auswurfdefizit nach Myokardinfarkt¹². Frauen haben ein niedrigeres Risiko der Progredienz einer linksventrikulären Hypertrophie in eine Herzinsuffizienz¹³. Dagegen ist ihr relatives Risiko an einer manifesten Herzinsuffizienz zu versterben deutlich erhöht¹⁴. Während der präpubertären Entwicklung steht die Zunahme der Masse des linken Ventrikels geschlechtsunabhängig in sehr engem Zusammenhang mit der Körpergröße¹⁵. Postpubertär weisen Männer dagegen eine um 15 bis 30% höhere Herzmasse als Frauen auf¹⁶. Im Gegensatz zu Männern geht der

physiologische Alterungsprozess des Herzens bei Frauen kaum mit verstärktem Zelluntergang und damit verbundener reaktiver Hypertrophie der verbliebenen Kardiomyozyten einher¹⁷. Nach der Menopause steigt die Prävalenz der linksventrikulären Hypertrophie pro Lebensdekade bei Frauen allerdings mehr als 4.5-mal so stark wie bei Männern¹³. Diese klinischen Daten legen einen Einfluss von Östrogen auf das Herzkreislaufsystem nahe, sodass die Untersuchung der zu Grunde liegenden zellulären und molekularen Prozesse zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung rückt.

1.2. Hypertrophe Signaltransduktionswege in Kardiomyozyten

1.2.1. Hypertrophe Stimuli

Es existieren zwei Gruppen von Stimuli, die eine kardiale Hypertrophie initiieren: Biomechanische Vorgänge und neurohumorale Faktoren, die mit der Freisetzung von Hormonen sowie para- und autokrinen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren assoziiert sind^{10, 18}. Man geht davon aus, dass biomechanische Signale von intrazellulären dehnungssensitiven Rezeptoren verarbeitet werden¹⁰. Neurohumorale Liganden binden an eine Unmenge von membrangebundenen, zum Teil G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit intrazellulärer Kinaseaktivität¹⁰. Die Vielzahl an Rezeptoren scheint in eine gemeinsame Gruppe von Signaltransduktionswegen zu münden, welche das hypertrophe Wachstum durch eine veränderte Genexpression im Zellkern, eine verstärkte Proteintranslation sowie verminderten Proteinabbau im Zytoplasma regulieren¹⁰. Typischerweise kommt es zur Reprogrammierung der Genexpression fetaler Proteinisoformen im adulten Herzmuskel wie β -MHC oder α -skeletalem Aktin¹⁹. Darüber hinaus scheint auch die durch Phosphorylierung erzielte Aktivierung von Histondeacetylasen und Histoneacetyltransferasen an hypertrophen Prozessen beteiligt zu sein: Diese vermitteln eine Konformationsänderung des Chromatins, was die Transkriptionsaktivität des entsprechenden Genloci, beispielsweise von MEF-2, gezielt verstärkt oder abschwächt²⁰⁻²¹.

ET-1, Angiotensin II und α -adrenerge Katecholamine üben ihre intrazelluläre Wirkung über die Bindung an einen $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$ -gekoppelten Rezeptor aus¹⁰. Diese G-Protein-Subklasse aktiviert Phospholipase C β und scheint unter Vermittlung von Proteinkinase C eine wichtige Rolle im Rahmen der maladaptiven Hypertrophie zu spielen¹⁰.

Durch IGF-1 über Rezeptoren mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität beeinflusste Signalwege sind dagegen bedeutend bei der adaptiven Hypertrophie sowie im Rahmen des Herzwachstums während der normalen körperlichen Entwicklung¹⁰. So konnte in einem Mausmodell mit überexprimierten IGF-1-Rezeptoren eine kardiale Hypertrophie ohne die Anzeichen einer Histopathologie nachgewiesen werden²². Im Gegensatz zur maladaptiven Hypertrophie wurde für die adaptive im Rattenmodell eine Zunahme des α -MHC-Homodimers mit hoher ATPase-Aktivität gezeigt, sodass davon auszugehen ist, dass es sich bei diesen beiden Formen der Hypertrophie um zwei eindeutig unterschiedliche biologische Phänomene handelt²³. Die IGF-1-Rezeptoraktivierung führt zur Phosphorylierung des IRS, welches beispielsweise mit Ras oder der PI3K interagiert und damit die zugehörigen Signalwege aktiviert²⁴.

Von entscheidender Bedeutung für die kardiale Entwicklung und Differenzierung scheint die durch Wnt-Proteine, die extrazelluläre Wachstumsfaktoren darstellen, initiierte Signaltransduktion zu sein²⁵. Man unterscheidet bei dieser Signalkaskade einen β -Catenin-abhängigen von einem β -Catenin-unabhängigen Weg²⁵. Die nukleäre Akkumulation von β -Catenin beeinflusst dabei Zielgene der kardialen Entwicklung²⁵. Einem β -Catenin-unabhängigen Weg der Wnt-Wirkung entspricht die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges. Man geht heute davon aus, dass diese Signalkaskade über eine Dysregulation der intrazellulären Calciumhomöostase ein entscheidendes Merkmal für den Übergang einer kompensatorischen Herzmuskelhypertrophie in eine Herzinsuffizienz darstellt²⁶. Als Reaktion auf hypoxischen Stress wird die Aktivierung von gp130 durch Zytokine gesehen²⁷⁻²⁸. Dadurch wird unter anderem der JAK/STAT-Signalweg aktiviert, dem eine Schlüsselrolle in der kardialen Hypertrophie sowie eine protektive Wirkung bezüglich des Übergangs in eine Herzinsuffizienz zugeschrieben wird²⁹⁻³⁰. Neben der Aktivierung des JAK/STAT-Weges scheint der gp130-Zytokinrezeptor-Komplex zwei weitere hypertrophe Zellsignalwege zu beeinflussen: Einerseits kommt es zur MAPK-Aktivierung, möglicherweise unter Beteiligung von Ras, worüber der konventionelle Signalweg in Gang gesetzt wird^{27, 31-32}. Andererseits kommt es unter Vermittlung von JAK1 zur Aktivierung von PI3K, sodass auch eine Interaktion mit dem Akt/mTor-Signalweg stattfindet³³.

Sowohl der Erk- als auch der Akt/mTor-Signalweg spielen eine besondere Rolle bei der Vermittlung adaptiv hypertropher Effekte und wurden daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.2.2. Der MAPK–Signalweg

Der MAPK–Weg stellt eine zentrale, dreistufige Kaskade in der Verarbeitung extrazellulärer Signale dar und nimmt damit Einfluss auf eine Vielzahl intrazellulärer Abläufe wie Zelldifferenzierung, –bewegung, –teilung und –tod ³¹. Die Kaskade wird unter anderem angestoßen durch die Bindung von Liganden an heterotrimere GPCRs oder Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, die an kleine G–Proteine wie zum Beispiel Rho oder Ras gekoppelt sind ¹⁰. Aber auch Stressfaktoren wie beispielsweise Dehnung spielen eine Rolle ³⁴. Durch Phosphorylierungen werden dann stufenweise zunächst die MAPKKK, durch diese die MAPKK und dadurch letztendlich die MAPK aktiviert ³¹. Während die MAPKKKs verschiedene MAPKKs phosphorylieren können, sodass ein verzweigtes Netzwerk entsteht, aktivieren die MAPKKs die finalen MAPKs relativ spezifisch ³⁵. Kennzeichnend für den MAPK–Weg ist eine komplexe Interaktion mit anderen Signaltransduktionswegen ³⁶. Zur Gruppe der MAPK zählen neben Erk1/2 auch die p38–MAPKs und JNKs (Abb. 3).

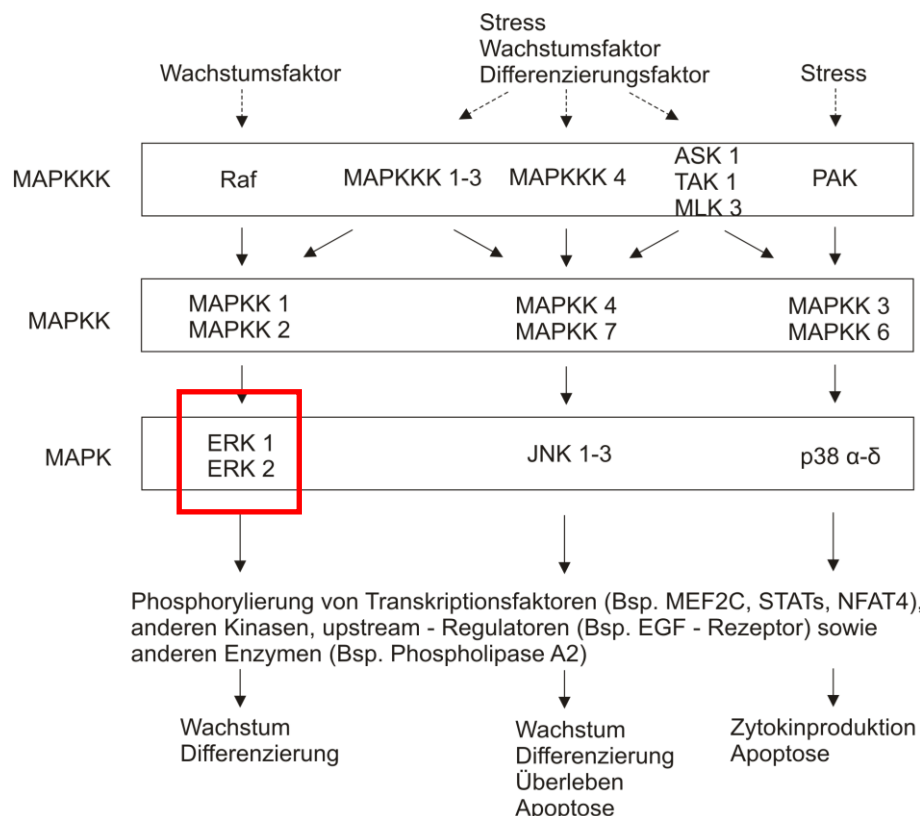


Abb. 3: Vereinfachte Übersicht ausgewählter Kinasen des MAPK–Signalweges, welche die Hypertrophie beeinflussen (modifiziert nach Garrington et al., Curr Opin Cell Biol, 1999).

Die Rolle von Erk1/2 ist nicht abschließend geklärt: In einem Mausmodell mit überexprimierter MAPKK1 konnte eine sogenannte kompensierte, lang andauernde

konzentrische Hypertrophie mit verbesserter kardialer Pumpfunktion beobachtet werden³⁷. Es wurde aber auch beobachtet, dass eine *in vitro* Zunahme der Zellgröße unter maladaptiv-hypertrophen Bedingungen durch eine spezifische Blockade des Erk-Signalweges verhindert werden konnte³⁸. Zur Untersuchung des Erk-Signalweges hat sich unter anderem der MAPKK1/2-Blocker PD184352 etabliert (Abb. 4)³⁹.

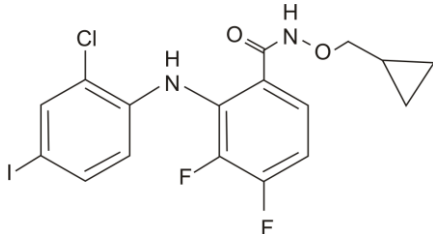


Abb. 4: Strukturformel des MAPKK1/2-Blockers PD184352.

1.2.3. Der Akt/mTor-Signalweg

Der Akt/mTor-Signalweg ist unter anderem über die Beeinflussung von Zellwachstum, -überleben und -proliferation ein zentraler Bestandteil zellulärer Regulationsmechanismen⁴⁰. Er wird dabei durch zahlreiche Faktoren wie Nährstoffe, das zelluläre Energieniveau, Hypoxie, Wachstumsfaktoren oder mechanische Belastung aktiviert⁴¹. Die Initiierung der Kaskade erfolgt durch PI3Ks, welche zur Familie von Enzymen sowohl mit Protein- als auch Lipidkinaseaktivität gehören²¹. Die heterodimeren Enzyme lassen sich unter anderem an Hand von Substratspezifität und Gewebeverteilung in Subgruppen unterteilen: Die kardialen PI3Ks mit Einfluss auf hypertrophe Signalwege gehören zu den Klassen IA und IB und bestehen typischerweise aus einer regulatorischen sowie aus einer katalytischen Untereinheit⁴². Die IA-Kinasen beispielsweise besitzen die Untereinheiten p110 α und p85, wobei p110 α die Enzymaktivität aufweist, die im basalen Zustand durch p85 blockiert wird⁴³. Ihre Aktivierung resultiert aus der Anlagerung der Kinase an die intrazelluläre Domäne von ligandenbindenden Transmembranrezeptoren, die beispielsweise eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen (IGF-1-Rezeptor), indirekt an Tyrosinkinasen (IL-6-Rezeptor) oder G-Protein gekoppelt sind (β -adrenerger Rezeptor)⁴⁴. Auch eine direkte Interaktion mit Ras ist beschrieben⁴⁵. Nach Lokalisation an die Zellmembran katalysieren die PI3Ks den Transfer von Phosphatgruppen von ATP auf die Inositolringe von membranständigen Phosphoinositolphosphaten, sodass Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphate sowie Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate generiert werden⁴⁶. Akt verfügt über eine sogenannte Pleckstrinhomologie-Domäne, über welche die Proteininteraktion mit den an 3'-phosphorylierten Lipiden vermittelt wird⁴⁷. Akt, auch

als PKB bezeichnet, besitzt neben der N-terminalen PH-Domäne eine zentrale katalytische Einheit sowie einen C-terminalen regulatorischen Bereich mit hydrophoben Motiven und weist eine große Homologie seiner Aminosäuresequenz mit PKA und PKC auf⁴². Es existieren drei Akt-Isoformen, von denen Akt1 und 2, beziehungsweise PKB α und β , im Herzen exprimiert werden⁴⁸. Neben basal phosphorylierten Serin- und Threoninresten konnten zwei Phosphorylierungen gefunden werden, die für die enzymatische Aktivierung von Akt entscheidend sind: Thr308, das sich in der zentralen katalytischen Einheit befindet, sowie Ser473, welches in der regulatorischen Domäne lokalisiert ist⁴⁹. Durch die Translokation von Akt an die Zellmembran und der damit verbundenen Konformationsänderung wird der Thr308-Rest PDK1 zugänglich gemacht⁵⁰. PDK1 verfügt ebenfalls über eine PH-Domäne und ihre PI3K-abhängige Kolo-kalisation an der Zellmembran scheint für die volle Aktivierung von Akt notwendig zu sein⁵¹. Allerdings wurde auch ein PI3K-unabhängiger Weg der Akt-Aktivierung beschrieben: Ein Beispiel stellt ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel dar, der über die Aktivierung Calcium/Calmodulin-abhängiger Kinasen eine direkte Phosphorylierung von Thr308 zur Folge hat⁵². Die Vorgänge, die zur Phosphorylierung von Ser473 führen, sind dagegen noch nicht abschließend geklärt: Ein wesentlicher Mechanismus ist die Phosphorylierung durch den mTor/Rictor-Komplex (mTORC2)⁵³. Zudem scheint es auch zu einer Autophosphorylierung an dieser Phosphorylierungsstelle nach Membrantranslokation zu kommen⁵⁴⁻⁵⁵. In bestimmten Zellen wurden weitere Kinasen wie zum Beispiel ILK-1 gefunden, die Akt an Ser473 phosphorylieren können⁵⁶. Für die aktivierte PKB mit einer Spezifität für Serin- und Threoninreste, die ihre enzymatische Funktion neben dem Zytoplasma auch in Mitochondrien oder dem Zellkern ausübt, wurden inzwischen mehr als 50 Proteine als mögliche Substrate identifiziert^{42, 46, 48}. Dazu zählt unter anderem Bad, ein Protein der BCL-2-Familie, die eine wichtige Komponente des intrinsischen programmierten Zelltodes darstellt⁵⁷. Durch seine Phosphorylierung kommt es zur Blockade der von Bad induzierten Signalkaskade mit der Folge, dass die Apoptose gehemmt und damit das Überleben der Zelle gefördert wird⁵⁷. Ein Beispiel für die mitochondriale Aktivität von Akt stellt die Phosphorylierung von GSK3 β dar⁵⁸. Diese Serin-/Threoninkinase existiert in zwei Isoformen, welche beide kardial exprimiert werden: α unterscheidet sich dabei von β durch eine zusätzliche N-terminale, Glycin-reiche Domäne⁵⁹. GSK3 ist im Gegensatz zu den meisten anderen Kinasen typischerweise konstitutiv aktiv und wird durch den Einfluss verschiedenster zellaktivierender Faktoren inhibiert⁶⁰. Da die GSK3-vermittelte

Phosphorylierung normalerweise zu einer Inaktivierung ihrer Substrate führt, hat die Hemmung der GSK3-Kinase eine funktionelle Aktivierung der downstream Signalwege zur Folge⁶⁰. Neben seiner ursprünglich bekannten Funktion der Phosphorylierung und damit Inhibierung der Glykogensynthese gehören heute unter anderem auch eIF2B, ein Initiationsfaktor der Proteintranslation, c-Jun und NFAT zu den Zielproteinen, welche unter dem Einfluss von GSK3 β inaktiviert oder degradiert werden⁶¹. Eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der Kinase erfolgt durch deren Phosphorylierung an Serin-Resten unter anderem durch Akt: Ser9 bei der β -Isoform sowie Ser21 bei der α -Isoform⁶². Die GSK3-Hemmung scheint beispielsweise aufgrund der daraus resultierenden NFAT-Aktivierung einen hypertrophen Effekt auf die Zelle zu haben⁶³. Durch die Phosphorylierung von GSK3 β wird die Öffnungsschwelle für mitochondriale Poren erhöht, was durch eine verringerte Nekroserate einen kardioprotektiven Effekt darstellt⁶⁴. Eine weitere entscheidende Aufgabe kommt Akt bei der Aktivierung des mTor/Raptor-Komplexes (mTORC1) zu⁶⁵. Das 289 kDa schwere Protein mTor gehört zur Familie der PI3K-verwandten Kinasen.

Dieser Signalweg ist in allen Eukaryonten dafür verantwortlich, das Energie- sowie Nährstoffangebot in Zellwachstum und -teilung umzusetzen^{41, 66}. mTORC1 besteht neben der mTor-Kinase aus dem Gerüstprotein Raptor sowie dem regulatorischen Protein PRAS40⁶⁶. Eine Kurzzeitinkubation mit dem Makrolid Rapamycin führt zur Blockierung und Dissoziation dieses mTor-Komplexes⁶⁶. Man geht davon aus, dass die Aktivierung von mTORC1 indirekt über TSC und Rheb verläuft⁶⁷. Die Tumorsuppressoren TSC1 und 2 bilden einen Proteinkomplex, wobei TSC1 regulatorische Aufgaben zu übernehmen scheint, während TSC2 die katalytische Funktion aufweist⁶⁵. In hypophosphorylierter Form liegt der TSC-Komplex über TSC1 und Hamartin vermittelt membrangebunden vor und ist damit kolokalisiert mit Rheb, dessen Tätigkeit durch das GTPase aktivierende Protein von TSC2 blockiert wird⁶⁸. Rheb ist ein kleines G-Protein aus der Ras-Superfamilie, das untypischerweise eine nur sehr schwach ausgeprägte intrinsische GTPase Aktivität besitzt⁶⁵. Die Phosphorylierung von TSC2 durch Akt führt nicht zu einer Reduktion seiner Phosphataseaktivität, hat allerdings eine Translokation des Komplexes in das Zytosol zur Folge, wo es an zytosolische Proteine gebunden wird⁶⁸. Dadurch kommt es zur Akkumulation von GTP-bindendem Rheb und es erfolgt die Interaktion zwischen diesem und mTORC1, was zur Aktivierung der Kinase führt⁶⁹. Eine Phosphorylierung und damit Hemmung von TSC2 ist auch durch Erk möglich⁷⁰. Auch eine Inhibition

durch den Wnt–Signalweg, der über eine Hemmung von GSK3 läuft, ist bekannt ⁷¹. Es wurde allerdings ein zweiter, direkter und PRAS40–abhängiger Weg der mTor–Aktivierung durch Akt beschrieben. Durch die Bindung von PRAS40 an der mTor–Kinase–Domäne wird deren Aktivität unterdrückt ⁷². In Folge der Akt–abhängigen Phosphorylierung kommt es zur Assoziation von PRAS40 mit einem zytosolischen Ankerprotein, sodass eine mTor–Aktivierung möglich wird ⁷². Dies hat unter anderem eine Hemmung der Autophagie zur Folge ⁷³. Darüber hinaus existieren zwei Hauptsubstrate der aktivierten Kinase, die für die Regulation der RNA Translation von Bedeutung sind: P70S6K und 4EBP1 ⁷⁴. Für deren effiziente Phosphorylierung scheint allerdings das Vorhandensein von Raptor in dem Proteinkomplex unabdingbar zu sein ⁷⁵. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die Funktion von Raptor als Gerüstmolekül für die Substrate in dem Proteinkomplex dar ⁷⁵. Auch eine direkte Beeinflussung der mTor–Kinaseaktivität durch Raptor wurde beschrieben, wobei hier von zwei verschiedenen Möglichkeiten der Interaktion von mTor und Raptor ausgegangen wird: Für die enzymatisch–aktive Variante ist dabei die Bildung des instabilen Komplexes notwendig ⁷⁶. Die Interaktion mit den Zielproteinen scheint über ein weiteres Gerüstprotein, den mRNA–gebundenen eIF3, abzulaufen ⁷⁷. 4EBP1 ist ein Protein, das in seiner hypophosphorylierten Form durch die Bindung eukaryoter Initiationsfaktoren den Beginn der ribosomalen Proteintranslation unterdrückt ⁷⁸. Durch seine Phosphorylierung wird die hohe Affinität beispielsweise zu eIF4E reduziert und der Initiationsfaktor freigegeben, sodass dieser an die 5′–Kappe der mRNA binden kann ⁷⁸. Die Struktur von p70S6K wurde in vier funktionelle Domänen unterteilt: Einen sauren N–terminalen Abschnitt, eine katalytische Domäne, ein Verbindungssegment sowie eine C–terminale hydrophobe, autoinhibitorische Domäne ⁷⁷. Die Aktivierung der Kinase wird durch die Interaktion der einzelnen Bereiche gewährleistet, die aus voneinander abhängigen Phosphorylierungen resultiert ⁷⁹. Man geht davon aus, dass für die volle Kinaseaktivität die Phosphorylierung des Thr389–Restes, der sich C–terminal der katalytischen Domäne im Verbindungssegment befindet, durch mTORC1 entscheidend ist ⁷⁹. Darüber hinaus existieren mit Thr421 und Ser424 zwei Erk–spezifische Phosphorylierungsstellen ⁸⁰. Das ursprünglich entdeckte und damit auch namensgebende Substrat der Kinase ist das 40S ribosomale Protein S6 ⁸¹. Die Phosphorylierung von S6 scheint für die Rekrutierung so genannter 5′ TOP mRNA an das Ribosom von Bedeutung zu sein ⁸². Diese spezielle RNA kodiert ausschließlich für Proteine der Translation, beispielsweise ribosomale Proteine oder Elongationsfaktoren ⁸³.

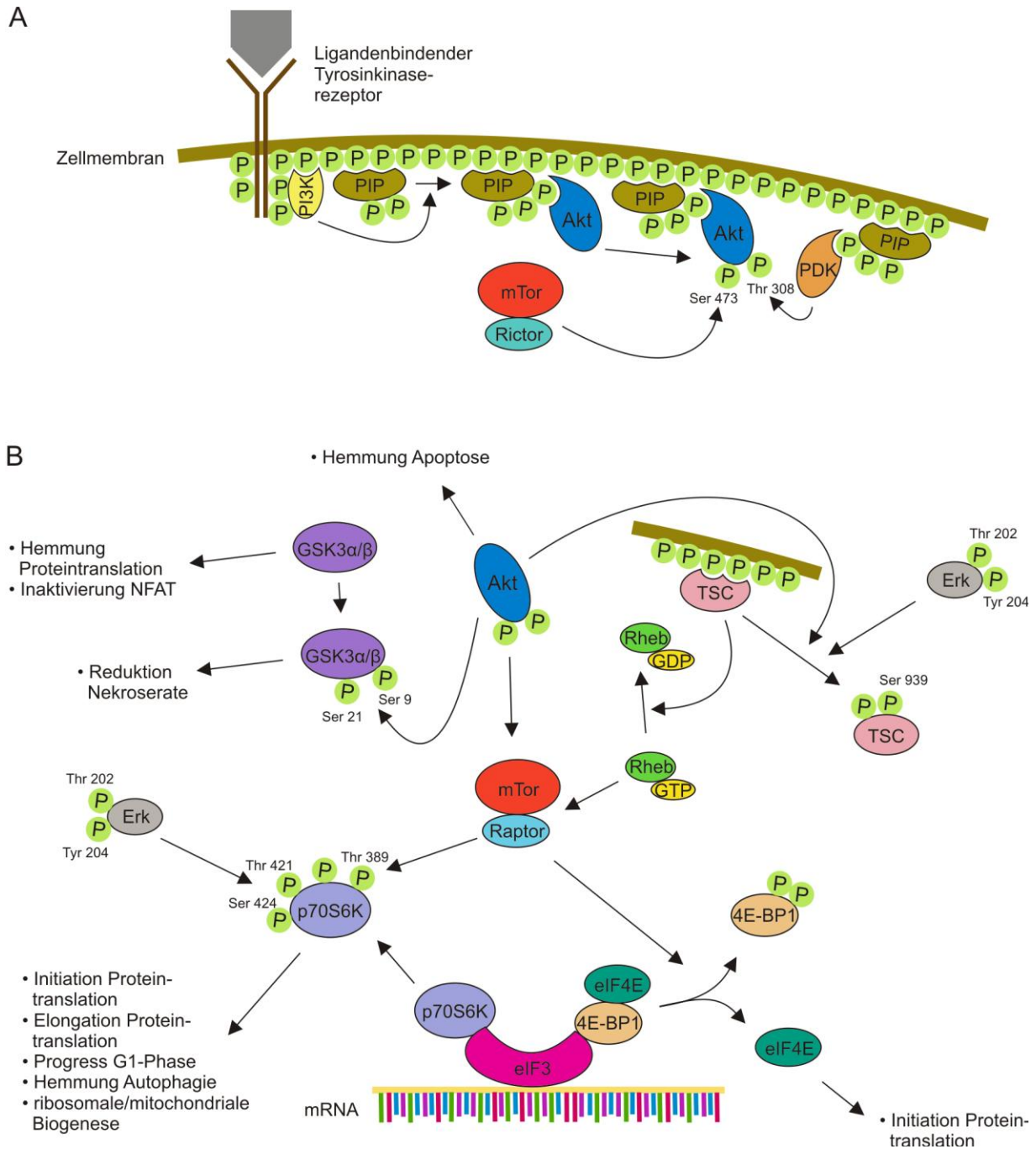


Abb. 5: Schematische Darstellung des Akt/mTor-Signalweges.

A: Die Aktivierung von Akt erfolgt an der Zellmembran. B: Die durch phosphoryliertes Akt angestoßene Signaltransduktionskaskade läuft in unterschiedlichen Zellkompartimenten ab und ist unter anderem über die Regulation der Proteintranslation durch p70S6K am Zellwachstum beteiligt.

Die Regulierung der ribosomalen Biosynthese scheint aber nicht der einzige Einfluss zu sein, den p70S6K auf den Translationsprozess ausübt⁷⁸. Die Kinase ist darüber hinaus auch an der Aktivierung für die Translation essentieller RNA-Helikasen, welche die sich in Haarschleifen befindliche mRNA linearisieren, beteiligt: Die Phosphorylierung von

eIF4B führt zu dessen Rekrutierung an den Translationspräinitiationskomplex⁸³. Dort verstärkt er die ATP-Bindungs-Affinität von eIF4A, was zu dessen erhöhter Helikasefunktion führt⁸³. Durch die Aktivierung von eEF2 beeinflusst p70S6K ebenfalls die Elongationsphase der Translation⁸⁴. Abb.5 gibt einen schematischen Überblick über die wichtigsten Kinaseaktivitäten des Akt/mTor-Signalweges.

Die Rolle der Signalkaskade für die Ausbildung einer adaptiven oder maladaptiven Herzmuskelhypertrophie ist nicht abschließend geklärt. In einem Mausmodell mit konstitutiv aktivem Akt konnte gezeigt werden, dass die Tiere in der akuten Phase zunächst eine adaptive kardiale Hypertrophie mit erhaltener Kontraktilität entwickelten, die in der chronischen Phase allerdings in eine Dilatation des Herzmuskels überging⁸⁵. Dagegen verstärkte eine Langzeitblockade von Akt bei Ratten die Entwicklung einer maladaptiven Hypertrophie und verhinderte die Ausbildung einer adaptiven Hypertrophie⁸⁶. Ein positiver kardialer Effekt wird besonders nukleär lokalisiertem Akt zugeschrieben: Dieses hat vor allem eine geringere Apoptoserate der Kardiomyozyten zur Folge⁸⁷.

1.3. Der Einfluss von Östrogen (E2) auf die Herzmuskelhypertrophie

1.3.1. E2 und seine Rezeptoren

Prämenopausale Frauen produzieren täglich ovariell zwischen 70 und 500 µg 17β-Östradiol (E2), welches das potenteste Östrogen darstellt⁸⁸. Neben seiner Schlüsselrolle als Sexualhormon wurde im Laufe der Zeit für E2 eine Vielzahl an biologischen Effekten unter anderem im kardiovaskulären, muskuloskeletalen, Immun- oder zentralen Nervensystem entdeckt⁸⁹. Während E2 als ein Vertreter der Steroidhormone bekanntermaßen in der Lage ist, die Genexpression zu regulieren, kann es auch nicht-genomisch intrazelluläre Signaltransduktionswege direkt beeinflussen⁹⁰. Die beiden Wege scheinen voneinander abhängig zu sein⁸⁸. Die intrazelluläre Wirkung von E2 läuft rezeptorvermittelt ab, wobei ERα und ERβ aus der Superfamilie der nukleären Rezeptoren die zuerst entdeckten und dadurch klassischen Vertreter darstellen (Abb. 6)⁸⁹. Bei den beiden Rezeptoren handelt es sich nicht um Isoformen, sondern um unterschiedliche Proteine, die von separaten Genen codiert werden⁸⁸. Dennoch besitzen sie evolutionär konservierte, strukturell und funktionell ähnliche Domänen⁸⁹.

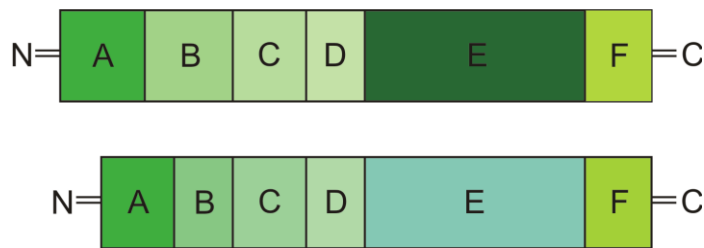


Abb. 6: Schematische Darstellung von ER α (oben) und ER β (unten) (modifiziert nach Arias-Loza et al., Gender Medicine, 2008).

Man weiß, dass die Domänen A und B, die größere Unterschiede in ihrer Sequenz und Länge zwischen den beiden Rezeptoren aufweisen, eine ligandenunabhängige, konstitutive transkriptionale Aktivität ausüben (abhängig vom Phosphorylierungsgrad des Rezeptors), während die Domäne C die Bindung des Rezeptors an die DNA ermöglicht und in Domäne D die Rezeptordimerisierung erfolgt^{89, 91}. Dort befindet sich außerdem das nukleäre Lokalisationssignal⁸⁸. Domäne E ist der am wenigsten konservierte Bereich der beiden Rezeptorsubtypen: Hier erfolgt die Bindung von E2 oder anderen Liganden und hier findet ebenfalls die ligandenabhängige transkriptionale Aktivierung östrogenregulierter Gene statt⁹¹. Die F-Domäne scheint eine komplexe modulierende Aufgabe bezüglich der Aktivität der ERs als Transkriptionsfaktoren zu übernehmen⁹². Genomische Effekte treten mit einer Verzögerung von 45 Minuten bis Stunden in Kraft⁹³⁻⁹⁴. Ein Beispiel stellt die verstärkte Expression der Stickstoffmonoxidsynthase sowie ANP dar⁹⁴. Von beiden Rezeptorsubtypen ist die Existenz mehrerer Splicevarianten bekannt, durch die möglicherweise die schnellen, nicht-genomischen Effekte von E2 erklärt werden können⁸⁹. Beide Rezeptorsubtypen kommen in unterschiedlichen Expressionsmustern in einer Vielzahl von Geweben im menschlichen Organismus vor⁹⁵. Dabei scheinen sowohl bestimmte Effekte eines der beiden Rezeptoren als auch agonistische oder antagonistische Interaktionen möglich zu sein^{88, 95}. Es ist bekannt, dass auch in Kardiomyozyten funktionelle Formen beider Rezeptorsubtypen exprimiert werden⁹⁶. ER α liegt dabei überwiegend nukleär lokalisiert vor, während ER β größtenteils zytoplasmatisch oder perinukleär detektiert wurde⁹⁷. Beiden Rezeptorsubtypen werden kardioprotektive Effekte zugeschrieben: In einem Mausmodell wurde ein ER β -vermittelter antihypertropher Effekt von E2 beobachtet, während in einer klinischen Studie ER α mit der Verhinderung der Progredienz einer dilatativen Kardiomyopathie in eine Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht wurde⁹⁸⁻⁹⁹.

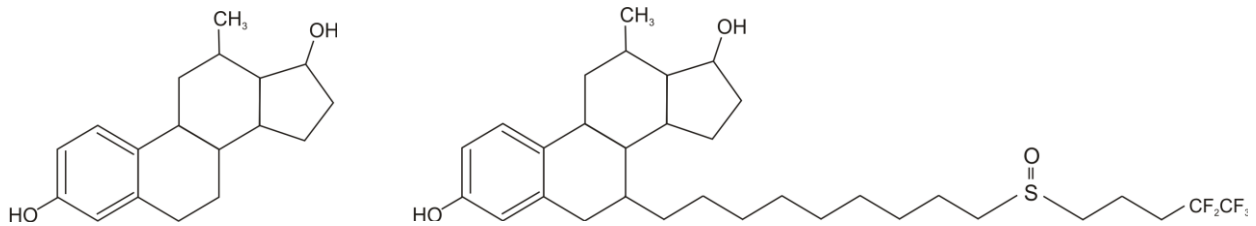


Abb. 7: Strukturformeln von E2 (links) und dem ER–Antagonist ICI182,780 (rechts).

Die ligandenabhängige Aktivität der ERs ist maßgeblich von der Konformationsänderung einer kurzen helikalen Region, H12, in Domäne E abhängig⁸⁹. ER–Antagonisten wie ICI182,780 (Fulvestrant) besitzen eine sperrige Seitenkette, sodass die agonistische Konformationsänderung von H12, die unter anderem die Interaktion mit Koregulatoren ermöglicht, sterisch blockiert wird (Abb. 7)⁸⁹. Die Bindung des Antagonisten führt darüber hinaus zu einer Verkürzung der ER–Halbwertszeit von drei Stunden bei E2–Bindung auf eine Stunde¹⁰⁰. Für die direkte Beeinflussung intrazellulärer Signalwege wird auch eine ER–unabhängige Bindung von E2 an den GPR30, einen zellmembranständigen Rezeptor aus der Superfamilie der GPCRs, diskutiert¹⁰¹. Dieser Rezeptor wird durch ICI182,780 sowie wenig aktive E2–Stereoisomere aktiviert¹⁰². Neben reinen ER–Agonisten und –Antagonisten wurden sogenannte selektive ER–Modulatoren (SERM) synthetisiert, die beispielsweise in Abhängigkeit des Rezeptorsubtyps oder vorhandener Koregulatoren in verschiedenen Organen eine E2–Aktivität imitieren oder antagonisieren¹⁰³⁻¹⁰⁴. Besondere Bedeutung kommt den SERMs unter anderem bei der Brustkrebs– oder Osteoporosetherapie zu.

1.3.2. Kardiale Effekte von E2

E2 bewirkt pleiotrope Effekte im kardiovaskulären System: Neben der Modulation der vaskulären Funktion, der Entzündungsreaktion, des Stoffwechsels und der Insulinsensitivität wird das Überleben von Kardiomyozyten sowie die Entwicklung einer Hypertrophie beeinflusst¹⁰⁵. Dabei sind einerseits direkte Effekte auf Gefäßzellen und Kardiomyozyten, andererseits indirekte systemische Effekte wie beispielsweise ein verbessertes Lipidprofil von Bedeutung¹⁰⁵.

In tierexperimentellen Studien führte eine E2–Behandlung unter anderem zu einer deutlichen Verringerung der Atherosklerose bei Affen, einer Verkleinerung der Infarktgröße bei Hasen, sowie reduzierter kardialer Hypertrophie bei Mäusen¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Typischerweise resultiert eine Bindung von E2 an den ER in dessen

Konformationsänderung, die mit einer Rezeptorhomodimerisierung verbunden ist ¹⁰⁵. Dies ermöglicht die Bindung an E2 responsive Elemente der DNA mit anschließender Regulation der Genexpression von Ionenkanälen, kontraktilen Proteinen, reaktiven Sauerstoffspezies und anderen ¹⁰⁵. Neben den genomischen Effekten beeinflusst E2 Signaltransduktionswege allerdings auch innerhalb von Sekunden bis Minuten ⁹⁰. In zahlreichen Experimenten konnte eine Interaktion der ERs mit Gerüstproteinen gezeigt werden, die zu einer Lokalisation des Rezeptors an die Zellmembran im Bereich von Caveolae führten ^{102, 109}. Der modulierende Einfluss von E2 auf hypertrophe Signaltransduktionswege wurde in zahlreichen Studien untersucht, die Erforschung der genauen antihypertrophen Wirkungsmechanismen von E2 ist dabei allerdings noch längst nicht abgeschlossen: Sowohl eine Aktivierung des PI3K/Akt- als auch des MAPK-Signalweges durch E2 ist bekannt ¹¹⁰. Beispielsweise wurden Interaktionen des ER α mit dem IGF1-Rezeptor beschrieben, die im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung von Erk1/2 führten ^{94, 111}. Aktiviertes Erk1/2 aber auch IGF-1 wiederum scheinen in der Lage zu sein, ER α zu phosphorylieren, was in einen liganden-unabhängigen Weg der Rezeptoraktivierung mündet ^{102, 112}. Akt-unabhängig wird mit der ER-aktivierten PI3K eine verstärkte nukleäre MCIP1-Expression in Verbindung gebracht, welche die Calcineurin-Aktivität senkt ⁹⁷. Darüber hinaus kommt es ER-abhängig zu einer verstärkten Ubiquitinierung und damit Degradation von Calcineurin durch E2 ¹¹³.

2. Fragestellung

Während für den Calcineurin–NFAT–Signalweg als Induktor der maladaptiven Hypertrophie zahlreiche Interaktionen mit Östrogen beschrieben wurden, ist die modulierende Wirkung des weiblichen Geschlechtshormons auf physiologische Adaptationsprozesse wie den Erk– und Akt/mTor–Signalweg noch weitgehend unerforscht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Beeinflussung des Erk– und Akt/mTor–Signalweges durch Östrogen in weiblichen murinen Kardiomyozyten zu untersuchen und herauszufinden, welche Konsequenzen sich daraus für die Trophik der Zellen unter adaptiv–hypertrophen Bedingungen ergeben. Das Hauptinteresse galt dabei der Untersuchung einer möglichen zusätzlichen Regulierung von mTORC1 als zentrale Kinase der Akt/mTor–Signalweges durch Östrogen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welche akuten, das heißt nicht–genomischen, Effekte hat Östrogen auf den Erk– und Akt/mTor–Signalweg in unstimulierten Kardiomyozyten?
Sind diese Effekte östrogenrezeptorabhängig?
2. Welche Rolle spielt Östrogen bei der Regulation des Akt/mTor–Signalweges unter Stimulation der Kardiomyozyten mit IGF–1 als adaptivem hypertrophen Stimulus?
Sind die Effekte östrogenrezeptorabhängig?
Welche Rolle spielt hier der Erk–Signalweg?
3. Wie und über welche Rezeptoren und Signalwege beeinflusst Östrogen die Entwicklung einer adaptiven Hypertrophie von Kardiomyozyten?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Absaugpumpe Vaku-Safe	IBS
Blotting-Kammer X Cell II Blot Module	InvitroGen
Blotting-Schwämme	InvitroGen
Dampfsterilisator CS-V-Labor	Webeco
Digitaler Heizblock	VWR
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD Biosciences
Elektrophoreseeinheit Mini-Protean Tetra Cell	Bio-RAD
Eppendorff-Pipetten (2.5, 10, 100, 200, 1000)	Eppendorff
Expositionskassette	Amersham Pharmacia Biotech
Feinwaage	Mettler
Finnpipetten (5–40 µl, 200–1000 µl)	Labsystems
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Flüssigstickstoffbehälter Arpege 110 Air liquide	VWR
Gefrier-, Kühlschrank	Liebherr
Gelgieß-Vorrichtung	Bio-RAD
Gelkämme (für 15 Probenfächer)	Bio-RAD
Glasplatten 1.5 mm Spacer	Bio-RAD
Glasplatten ohne Spacer	Bio-RAD
Heiz-, Magnetrührplatte	Heidolph
Inkubator	Thermo Scientific
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Heraeus, Thermo Scientific
Mikrotiterplatten-Reader Multiscan Ascent	Thermo Scientific
Multifuge 1S-R	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Superior Marienfeld Germany
pH-Meter	VWR
Pipetten (P10, 20, 100, 1000)	Gilson
Pipettierhilfe	Brand
Pipetus-akku	Hirschmann

power source 300 V	VWR
powersupply (Model 200/2.0)	Bio–RAD
Taumelrollenmischer	Marienfeld, Karl Hecht
Tischzentrifuge Galaxy Ministar	VWR
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph
Röntgenfilamentwicklungsmaschine Compact 2	Protec Medical Systems
Waage	Sartorius
Wasserbad	Unitherm
Vortexer	VWR
Zelleinfriergefäß	Nunc
Zellzähler	Infactory
Zentrifuge 200R	Hettich

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

CL–Xposure Filme	Thermo Scientific
Deckgläser rund (ø 14 mm)	R. Langenbrinck Labor– und Medizintechnik
FACS–Röhrchen	BD Falcon
Filter Tips (10, 100, 1000)	Biosphere
Filterpapier	Bio–RAD
Immuno–Module	Nunc
Kanülen	Microlance
Konische Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Falcon
Kopierfolien	Tartan
Kryoröhrchen (1.8 ml)	Sarstedt
Nitrocellulose Blotting–Membranen	Peqlab Biotechnologie GmbH
Objektträger	R. Langenbrinck Labor– und Medizintechnik
Pasteurpipetten	Brand
Safe–lock tubes (500 µl, 1.5, 2 ml)	Eppendorff
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Falcon
Spritzen Discardit II (10, 20 ml)	BD
Spritzenfilter 0.22 µm	Roth

Zellkulturplatten (6-, 12-well)	Falcon
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Falcon
Zellkulturschalen (4, 6, 10 cm)	Falcon
Zellschaber	Sarstedt

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Bio-RAD
Alexa488, Alexa568	Molecular Probes
APS	Roth
Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Inc.
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
Aqua bidest.	Millipore
β-GP	Applichem
β-Östradiol	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA	Serva
Claycomb-Medium w/o L-Glutamin	SAFC Biosciences
DAPI	Roche
Difco™ Gelatine	BD Biosciences
DMSO ≥ 99.5%	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA
DTT	Roth
EDTA ≥ 99% p.a.	Roth
Entwicklerlösung	AGFA
Ethanol 96%, vergällt mit Methylethylketon	Herbeta Arzneimittel
Ethanol ≥99.9%	J. T. Baker
Fibronectin	Sigma-Aldrich
Fixierlösung	AGFA
FKS, aktivkohleabsorbiert	PAN Biotech GmbH
FKS Claycomb	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerin 86% p.a.	Roth
Glycin	Serva

HCl	Roth
HEPES	Roth
ICI182,780	Ascent Scientific
Isopropanol	Roth
L–Glutamin	PAA
Magermilchpulver	Applichem
Medium199 w Earle’s Salts, w/o L–Glutamin, Phenolrot und Natriumbicarbonat	Sigma–Aldrich
Methanol ≥99.9% p.a.	Roth
NaF	Applichem
NaOH	Sigma–Aldrich
NaCl ≥99.5% p.a.	Merck
(±) Noradrenalin–Nitratsalz	Sigma–Aldrich
PD184352	Bio–RAD
Penicillin/Streptomycin	PAA
Phalloidin–Alexa488	Molecular Probes
Propidiumjodid	Fluka
Proteinmarker, vorgefärbt recombinant mouse IGF–1	New England BioLabs Immuno Tools
Roche complete	Roche Diagnostics GmbH
SDS	MP Biomedicals
Sojabohnen–Trypsininhibitor	GIBCO
TEMED	Sigma–Aldrich
TRIS	Roth
TritonX–100	Sigma–Aldrich
TX–Lösung (10x)	Biochrom AG
Tween20	Roth

3.1.4. Kits

D _c Protein Assay (Reagenz A, Reagenz B, Reagenz S)	Bio–RAD
Westernblot–Detektionsreagenz (Peroxidlösung, Luminol–Verstärkerlösung)	Thermo Scientific

3.1.5. Pufferrezepte

Blocking-Puffer (50 ml)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
BSA	0.5g	1%
Magermilchpulver	2.5g	5%
TBS/Tween- Waschpuffer	ad. 50ml	

Elektrophoresepuffer pH = 8.3 (10xStammlösung; 1 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
Glycin	150g	2M
SDS	10.00g	1%
TRIS	30.28g	250mM
aqua dest.	ad. 1l	

Elektrophoresepuffer pH = 8.3 (1x; 1 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
10x Elektrophoresepuffer	100ml	1x
aqua dest.	900ml	

FACS-Puffer (50 ml)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
EDTA (pH = 8.1)	500µl	5mM
FKS	500µl	1%
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	49ml	

Glycin – Stripping Puffer pH = 2.0 (1 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
Glycin	1.876g	25mM
SDS	100ml	1%
aqua dest.	ad. 1l	

HEPES/NaCl- Waschpuffer pH = 7.5 (1 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
HEPES	2.38g	10mM
NaCl	8.76g	150mM
aqua dest.	ad. 1l	

Lämmli-Proben-Puffer (3xStammlösung; 50 ml)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
Glycerol	15ml	30%
SDS	3g	6%
TRIS-HCl pH = 6.8	10ml	187.5mM
DTT	15ml	60mM
Bromphenolblau	150µl	0.3%
aqua dest.	7ml	

TBS-Stammlösung pH = 7.5 (10xStammlösung; 2 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
NaCl	160g	1.37M
TRIS Base	43.4g	180.7mM
aqua dest.	ad. 2l	

TBS/Tween-Waschpuffer pH = 7.5 (1x; 1 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
10xTBS	100ml	1x
Tween20	1ml	0.1%
aqua dest.	ad. 1l	

Transferpuffer pH = 8.3 (10xStammlösung; 1 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
Glycin	144g	1.92M
TRIS	30.28g	250mM
aqua dest.	ad. 1l	

Transferpuffer pH = 8.3 (1x; 1 l)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
Ethanol/Methanol	200ml	20%
10x Transferpuffer	100ml	1x
aqua dest.	700ml	

Triton-Lysispuffer (2xStammlösung; 10 ml)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
EDTA	80µl	4mM
Glycerol	4ml	20%
NaCl	2760µl	276mM
TRIS/HCl pH = 8.0	400µl	40mM
Triton-X100	2ml	2%
aqua dest.	760µl	

Triton - Lysispuffer (1x; 1 ml)		
Reagenz	Menge	finale Konz.
β-GP	10µl	10mM
NaF	20µl	10mM
Na ₄ P ₂ O ₇	20µl	2mM
Na ₃ VO ₄	10µl	1mM
Roche complete	40µl	1x
2xTriton-Lysispuffer	500µl	1x
aqua dest.	400 µl	

3.1.6. Medien

Supplementiertes Claycomb-Medium pH = 7.1–7.4 (100 ml)		
Substanz	Menge	finale Konz.
Claycomb-Medium	87ml	
FKS	10ml	10%
NA	1ml	100µM
P/S	1ml	100U/ml
Q	1ml	2mM

Das Claycomb-Medium wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. FKS, P/S und Q wurden bei -20 °C aufbewahrt. NA wurde durch das Lösen von 80 mg Noradrenalin-Nitratsalz

in 25 ml einer 30 mM Ascorbinsäure hergestellt. Nach dem Sterilfiltrieren wurde auch diese Lösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Das CCC wurde lichtgeschützt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb einer Woche verbraucht. Vor der Zugabe zu den Zellen wurde es im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt.

Medium199 pH = 7.5 (1 l)		
Substanz	Menge	finale Konz.
Medium199	9.4g	
NaHCO ₃	2.2g	26mM
P/S	10ml	100U/ml
Q	10ml	2mM

Medium199 wurde in Pulverform bezogen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach dem Lösen der Substanz in aqua dest. wurde der pH-Wert mittels HCl beziehungsweise NaOH eingestellt. Anschließend wurde das Medium steril filtriert, mit Q und P/S versetzt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt aufbewahrt. Auch dieses Medium wurde vor der Zugabe zu den Zellen im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Bei Langzeitversuchen wurde am jeweils ersten Tag der Stimulation Medium199 verwendet, das zusätzlich 1 oder 2.5% gestripptes FKS enthielt.

Einfriermedium (1.5 ml)		
Substanz	Menge	finale Konz.
DMSO	75 μ l	5%
FKS	1.425ml	95%

Das Einfriermedium wurde direkt vor dem Wegfrieren der Zellen frisch hergestellt. DMSO wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.7. Polyacrylamid–Gel–Rezepte

Trenngel

Prozentigkeit/ Gel	Anzahl	aqua bidest.	Acrylamid (30%)	Trenn- gelpuffer	SDS (10%)	TEMED	APS (10%)
8% 250–40kDa	2Gele	6.84ml	3.96ml	3.8ml	150µl	30ml	75µl
10% 250–25kDa	2Gele	5.85ml	4.95ml	3.8ml	150µl	30µl	75µl

Bei dem Trenngelpuffer handelte es sich um eine 1500 mM Tris/HCl–Lösung (pH = 8.8). Zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 60 kDa wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet, für den Nachweis von Proteinen eines größeren Molekulargewichtes 8%ige Gele.

Sammelgel

Prozentigkeit/ Gel	Anzahl	aqua bidest.	Acrylamid (30%)	Sammel- gelpuffer	SDS (10%)	TEMED	APS (10%)
5%	2Gele	4.08ml	1.23ml	1.9ml	75µl	19µl	57µl

Bei dem Sammelgelpuffer handelte es sich um eine 500 mM Tris/HCl–Lösung (pH = 6.8).

3.1.8. Antikörper

Primärantikörper

Antikörperspezifität	Phosphory- lierungsstelle	Spezies	Spezifität	Verdünnung (Western- blot)	Moleku- largewicht Protein
anti–Akt		Kaninchen	polyklonal	1:1.000	60kDa
anti–β–Aktin		Maus	mono- klonal	1:10.000	42kDa
anti–pAkt	Ser473	Kaninchen	mono- klonal	1:1.000	60kDa
anti–pGSK–3α/β	Ser21/9	Kaninchen	polyklonal	1:1.000	46,51kDa
anti– p44/42MAPKinase		Kaninchen	polyklonal	1:1.000	42,44kDa

anti-p70S6Kinase		Kaninchen	polyklonal	1:3.000	70kDa
anti-pp44/42MAPKinase	Thr202/ Tyr204	Kaninchen	polyklonal	1:1.000	42,44kDa
anti-pp70S6Kinase	Thr389	Kaninchen	polyklonal	1:1.000	70kDa
	Thr421/ Ser424	Kaninchen	polyklonal	1:1.000	70kDa
anti-pTSC2	Ser939	Kaninchen	polyklonal	1:500	200kDa
anti- α -Tubulin		Maus	mono- klonal	1:10.000	50kDa

Die Antikörper gegen β -Aktin und α -Tubulin wurden von Sigma-Aldrich bezogen, anti-p70S6Kinase und anti-pp70S6Kinase von R&D. Alle anderen Primäantikörper stammten von Cell Signaling. Sie wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in einer 1%igen BSA-TBS/Tween-Lösung. Für den pp70S6Kinase (Thr389)-Antikörper wurde die Lösung zusätzlich mit Magermilchpulver (final 5%) versetzt. Die verdünnten Antikörperlösungen wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und maximal dreimal benutzt.

Sekundäantikörper

Antikörperspezifität	Spezies	kreuzabsorbiert gegen	Verdünnung (Western- blot)
anti-Kaninchen	Esel	Maus	1:15.000
anti-Maus	Esel	Kaninchen	1:20.000

Die Sekundäantikörper stammten von Dianova. Es handelte sich um meerrettichperoxidase-gekoppelte Antikörper. Auch sie wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und ebenfalls in einer 1%igen BSA-TBS/Tween-Lösung verdünnt.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Zelllinie

Als Modellzelllinie für alle durchgeführten Versuche dienten HL–1–Zellen. Dabei handelte es sich um immortalisierte weibliche murine Kardiomyozyten, welche von W. C. Claycomb zur Verfügung gestellt wurden ¹¹⁴. Im 37 °C warmen Inkubator herrschte eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5%igem CO₂–Anteil.

3.2.1.2. Beschichten von Zellkulturbehältnissen

Vor der Zellaussaat mussten die Zellkulturbehältnisse mit einer Gelatine/FN–Lösung beschichtet werden. Zu 50 ml einer 0.02%igen Gelatine–Lösung wurden unter sterilen Bedingungen 250 µl FN zugegeben (final 0.5%) und die Behältnisse damit wie folgt beschichtet:

Behältnis	ml Gelatine/FN
75cm ² ZKF	4.0
25cm ² ZKF	2.0
6cm ZKS	1.5
12–Well– Platte	0.5/Well
6–Well–Platte	1/Well

Die Behältnisse wurden mit der Beschichtungslösung über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für Fluoreszenzfärbungen erfolgte die Beschichtung von sterilen runden Deckgläsern in 6–Well–Platten in analoger Weise.

3.2.1.3. Auftauen von Zellen

Zunächst wurden in eine beschichtete 75 cm² ZKF CCC vorgelegt. Die Flasche wurde anschließend im Brutschrank inkubiert. Die in Flüssigstickstoff in einem Kryoröhrchen mit Einfriermedium gelagerten Zellen wurden im Wasserbad in etwa 2 min schnell aufgetaut und danach in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit CCC überführt. Das Röhrchen wurde mit 500 g 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet vorsichtig in frischem CCC resuspendiert und die Suspension in die

vorbereitete ZKF überführt. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium nach 4 bis 6 Stunden durch 15 ml frisches CCC ersetzt.

3.2.1.4. Zellpassage

Zu passagierende ZKF hatten stets 100% Zellkonfluenz. Nach Absaugen des CCC wurden die Zellen kurz mit 2.5 ml 1xTX gewaschen. Dieses wurde durch 2.5 ml neues ersetzt und die Flasche 2min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte wieder ein Wechsel des 1xTX und die ZKF wurde für weitere 4 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden noch adherente Zellen durch Abklopfen der Flasche an der Handfläche gelöst. Das 1xTX wurde durch das Zupipettieren von 2.5 ml Trypsin–Sojabohneninhibitor (final 0.025%, in PBS gelöst) inaktiviert und die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die ZKF wurde mit CCC noch einmal nachgespült. Das Zentrifugenröhrchen wurde 4 min mit 400 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit CCC resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 2 oder 3 neue ZKF aufgeteilt. Das Gesamtvolumen an CCC in den neuen ZKF betrug 8 ml (bei 1– bis 2–tägigem Medienwechsel) oder 14 ml (Medienwechsel vor dem Wochenende). Neben neuen ZKF wurden an den Passagetagen auch ZKS und Well–Platten für Versuche angelegt. Dazu erfolgte eine mikroskopische Auszählung von 20 µl Zellsuspension mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Durch entsprechende Verdünnung mit CCC konnte dann eine definierte Zellzahl in die jeweiligen Zellkulturbehältnisse ausgesetzt werden:

Behältnis	Verwendung für	Anzahl Zellen	ml CCC
6cm ZKS (Kurzzeit)	Western Blot	1.2×10^6	2
6cm ZKS (Langzeit)	Western Blot	1.3×10^6	2
6–Well–Platte	Fluoreszenz–färbung	2.4×10^6	1.5/Well
12–Well–Platte	FACS	3×10^6	1/Well

3.2.1.5. Einfrieren von Zellen

Prinzipiell wurde der 100% konfluente Zellinhalt einer 75 cm² ZKF (entspricht 10^7 Zellen) in einem 1.8ml Kryoröhrchen tief gefroren. Die auf oben beschriebene Weise abtrypsinieren Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und ebenfalls 4 min mit 400

g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1.5 ml Einfriermedium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in das Kryoröhrchen pipettiert und dieses in ein Gefriergefäß, das Isopropanol bei Raumtemperatur enthielt, gesteckt. Das Gefriergefäß wurde umgehend in einen $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Tiefkühlschrank gestellt, wo die Zellen mit einem Temperaturverlust von $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute gefroren wurden. Das dem Einfriermedium zugesetzte DMSO diente dabei der Limitierung intrazellulärer Eiskristallformationen. Am folgenden Tag wurde das Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstoffbehälter umgelagert und dort bis zum Auftauen aufbewahrt.

3.2.1.6. Zellstimulation

Für die Versuche wurden Zellen von Passage 62 bis 93 verwendet. Zum Zeitpunkt der Stimulation betrug die Zellkonfluenz 85 bis 95%. Die Inkubation der Zellen erfolgte grundsätzlich im Brutschrank. Für jede Versuchsreihe wurden mindestens 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Abgesehen von den Versuchen zur Exploration der geeigneten Konzentrationen wurden die Versuche mit folgenden Konzentrationen der Stimulanzen bzw. Verdünnungen der Lösungsmittel durchgeführt:

Methode	Stimulanz	Konzentration	Lösungsmittel	Verdünnung
Western-blot	E2	10nM	Ethanol	10^{-6}
	ICI182,780	10 μ M	DMSO	10^{-3}
	PD184352	1 μ M	DMSO	10^{-4}
	IGF-1	10nM	aqua dest.	5×10^{-4}
FACS	E2	10nM	Ethanol	10^{-6}
	ICI182,780	10 μ M	DMSO	10^{-3}
	PD184352	100nM	DMSO	10^{-5}
	IGF-1	20nM	aqua dest.	10^{-3}

Dabei wurde mit dem E2-Rezeptor-Antagonist ICI182,780 die Abhängigkeit der E2-vermittelten Effekte von ERs untersucht. Eine Blockade des Erk-Signalweges erfolgte mit PD184352, einem MAPKK1/2-Inhibitor. IGF-1 diente als Determinante der adaptiven Hypertrophie. Die entsprechenden Verdünnungen erfolgten mit Medium199.

Kurzzeitstimulation

Konzentrationsreihe E2

Am Tag nach der Zellaussaat erfolgte ein Medienwechsel mit 1.9 ml Medium199 pro 6 cm ZKS, das zusätzlich Ethanol (10^{-7} bis 10^{-5}) enthielt. Am darauf folgenden Stimulationstag erhielten die Zellen zusätzlich 100 μ l Medium199 (Kontrolle), Ethanol (final 10^{-7} bis 10^{-5}) oder E2 (final 1 bis 100 nM) und wurden 90 min inkubiert.

Zeitreihe E2

Am Tag nach der Zellaussaat fand ein Medienwechsel mit 1.9 ml Medium199 pro 6 cm ZKS, das zusätzlich Ethanol (10^{-6}) enthielt, statt. 24 Stunden später erfolgte dann die Stimulation der Zellen unter Zugabe von 100 μ l Medium199 (Kontrolle), Ethanol (final 10^{-6}) oder E2 (final 10 nM) über einen Zeitraum von 5 bis 120 min.

Um den Effekt von DMSO, dem Lösungsmittel von ICI182,780, zu untersuchen, wurden auch Experimente durchgeführt, in denen die Zellen zusätzlich 60 min vor der eigentlichen Stimulation mit DMSO (10^{-3}) inkubiert wurden.

Konzentrationsreihe ICI182,780

Es erfolgte ebenfalls am Tag nach der Zellaussaat ein Medienwechsel mit 1.9 ml Medium199 versetzt mit Ethanol (10^{-6}). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit DMSO (10^{-6} bis 10^{-3}) oder ICI182,780 (10 nM bis 10 μ M) in unterschiedlichen Verdünnungen 60 min präinkubiert und anschließend 90 min mit Ethanol (10^{-6}) bzw. E2 (10 nM) stimuliert.

Zeitreihe ICI182,780

Der Medienwechsel am Folgetag der Zellaussaat verlief analog zu den Versuchen der ICI-Konzentrationsreihe. Am Stimulationstag wurden die Zellen zunächst 60 min mit DMSO (10^{-3}) bzw. ICI182,780 (10 μ M) präinkubiert. Danach erfolgte durch Zugabe von Ethanol (10^{-6}) bzw. E2 (10 nM) die Zellstimulation über einen Zeitraum von 30 bis 120 min.

Langzeitstimulation

Konzentrationsreihe PD 184352

An dem Tag nach der Zellaussaat wurde das CCC zunächst durch 2 ml Medium199 versetzt mit 2.5% gestripptem FKS und E2 (10 nM) ersetzt. Nach 24 Stunden erfolgte ein weiterer Medienwechsel analog zum Vortag jedoch ohne FKS. Nach weiteren 24 Stunden fand schließlich die Zellstimulation verbunden mit einem erneuten Medienwechsel statt: Alle Zellen wurden mit E2 (10 nM) präinkubiert, eine Hälfte erhielt zusätzlich DMSO (final 10^{-5} bis 10^{-4}), die andere Hälfte PD184352 (final 100 nM bis 1 μ M). Nach einer Stunde wurde jeweils einer Hälfte der mit DMSO bzw. PD184352 präinkubierten Zellen IGF-1 (final 10 nM) zugegeben. Die Zellen wurden für 24 Stunden stimuliert.

Zeitreihe PD184352

24 Stunden nach Zellaussaat erfolgte bei den 6cm ZKS (Western Blot) sowie bei den mit Glasdeckgläsern präparierten 6-Well-ZKP (Immunfluoreszenzfärbung) der Medienwechsel mit 2 ml Medium199 pro ZKS, welches zusätzlich 2.5% gestripptes FKS und E2 (10 nM) oder Ethanol (10^{-6}) enthielt. Am Folgetag wurde dieses durch FKS-freies Medium199 mit E2 oder Ethanol ersetzt. Am 3.Tag erfolgte schließlich die Zellstimulation: Verbunden mit einem erneuten Medienwechsel wurden die Zellen 1 Stunde mit E2 (10 nM) und PD184352 (1 μ M) bzw. den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol 10^{-6} für E2, DMSO 10^{-4} für PD184352) präinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von IGF-1 (final 10 nM) zu einem Teil der Zellen. Die Stimulationsdauer betrug 24 Stunden.

Bei den 12-Well-ZKP (FACS-Analyse) erfolgte der Medienwechsel mit 1ml Medium199 pro Well, welches während der ersten 24 Stunden mit 1% gestripptem FKS versetzt war. Die abschließende Zellstimulation erfolgte bereits am 2.Tag für 2 mal 24 Stunden.

Zeitreihe ICI182,780

Am Folgetag der Zellaussaat erfolgte zunächst die Präinkubation mit 1.9 ml Medium199 pro ZKS versetzt mit 2.5% gestripptem FKS sowie DMSO (10^{-3}) oder ICI182,780 (10 μ M). Nach 1 Stunde wurden jeder ZKS 100 μ l Ethanol (final 10^{-6}) oder E2 (final 10 nM)

zugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte ein erneuter Medienwechsel analog zum Vortag jedoch mit FKS-freiem Medium199. Am 3.Tag nach Zellaussaat fand die Zellstimulation statt: Hierbei wurde unter gleichen Bedingungen wie am Vortag nach 1 Stunde Präinkubation zu einem Teil der Zellen zusätzlich zu Ethanol oder E2 IGF-1 (final 10 nM) gegeben und anschließend 24 Stunden inkubiert.

Bei den 12-Well-ZKP erfolgte der Medienwechsel mit 1ml Medium199 pro Well, welches während der ersten 24 Stunden mit 1% gestripptem FKS versetzt war. Die abschließende Zellstimulation erfolgte bereits am 2.Tag für 2 mal 24 Stunden.

3.2.2. Proteindetektion mittels Westernblot

3.2.2.1. Zellyse und Proteinbestimmung

Nach beendeter Zellstimulation wurden die ZKS auf Eis gestellt und das Stimulationsmedium abgesaugt. Daran schloss sich das zweimalige Waschen mit HEPES/NaCl-Puffer an. Daraufhin wurden 30 µl Protease- und Phosphatase-inhibitoren enthaltender Triton-Lysispuffer auf die Zellen einer ZKS gegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in 1.5 ml safe-lock tubes überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellysate für 10 min bei 4 °C mit 14000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue tubes überführt. Die Ermittlung der Gesamtproteinkonzentration in den Überständen erfolgte mittels des kolorimetrischen D_C Protein Assays, der auf dem Lowry Assay von 1951 basiert: Hierfür wurde zusätzlich eine BSA-Standardproteinkonzentrationsreihe von 0 bis 2.5 mg/ml mit Hilfe des Triton-Lysispuffer hergestellt. Die Messung der Standardreihe und der Probenlysate erfolgte in Doppelbestimmung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Zu 5 µl Proteinlysate (Probenlysate 1:4 verdünnt) pro Well wurden 25 µl Reagenz A und S im Verhältnis 50:1 zupipetiert und anschließend 200µl Reagenz B. Es folgte eine 10-minütige Durchmischung auf dem Plattformschüttler bei Raumtemperatur. Die anschließende Messung im Mikrotiterplattenreader erfolgte bei einer Wellenlänge von 690 nm. Durch die Standardreihe konnten mittels der gemessenen Farbintensitäten die entsprechenden Proteinkonzentrationen in den Probenlysaten berechnet werden. Aus den Lysaten wurden durch Zugabe von Lämmli-DTT-Probenpuffer sowie aqua dest. Aliquots hergestellt, welche anschließend 5 min im 95 °C heißen Heizblock denaturiert wurden und bis zum Auftragen auf SDS-Gele bei -20 °C gelagert wurden. Die Aliquots enthielten eine Proteinmenge von jeweils 30 µg.

3.2.2.2. SDS–PAGE

Die SDS–Polyacrylamid–Gele wurden nach oben aufgeführten Rezepten hergestellt. Die Gele wurden in einem feuchten Milieu bei 4 °C gelagert und innerhalb von 3 Tagen benutzt. Das Volumen der aufzutragenden Aliquots variierte je nach Proteingehalt der Zelllysate zwischen 15 und 30 µl. Außer den Proben wurde ein vorgefärbter Proteinmarker, der einen Molekulargewichtsbereich von 7 bis 175 kDa umfasste, aufgetragen. Nach Auffüllen der Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer wurde die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht zunächst mit einer Spannung von 80 V begonnen. Nach Übertritt der Proteinfront in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Um eine übermäßige Erwärmung der Gele und damit verbundener möglicher Veränderung des Phosphorylierungsgrades der Proteine zu verhindern, vermieden wir Stromstärken über 450 mA (für 2 Gele). Die Proteinauftrennung wurde mit dem Austritt des Bromphenolblaus aus dem Gel beendet.

3.2.2.3. Westernblot

Der Proteintransfer eines Polyacrylamidgels auf eine 6x8.5 cm Nitrocellulosemembran erfolgte mittels der wet–Methode. Dabei waren das Gel und die Membran auf ihren Außenseiten von mit Transferpuffer befeuchteten Filterpapieren bedeckt sowie beidseits von 4 Blotting–Schwämmen umgeben, sodass die Entstehung von Luftblasen zwischen diesen beiden Schichten nach Möglichkeit verhindert wurde. Das Blotten erfolgte bei 30 V für 90 bis 120 min, für die Stromstärke wurde sich an einem Richtwert von 150 mA pro Blot orientiert. Zur Überprüfung der Gleichmäßigkeit des Proteintransfers über die gesamte Membran wurde diese im Anschluss mit Ponceau angefärbt (Abb. 8).

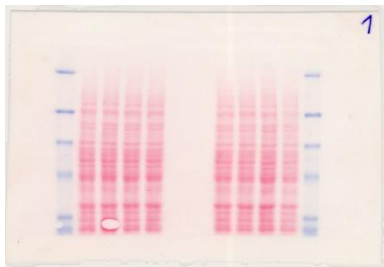


Abb. 8: Eine mit Ponceau angefärbte Nitrocellulosemembran nach Westernblot. Angefärbtes Protein erscheint rot, links und rechts außen ist der Proteinmarker in blau zu erkennen. Der weiße Fleck links unten entspricht einem Lufteinschluss zwischen Gel und Membran, sodass ein Proteintransfer an dieser Stelle nicht möglich war.

3.2.2.4. Blockierung unspezifischer Bindungen und Antikörperinkubation

Nach dem Blotten wurden die Nitrocellulosemembranen in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 bis 10 ml Blocking–Puffer eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollator

inkubiert mit dem Ziel, unspezifische Proteinbindungen während der weiteren Membranbehandlungen zu minimieren. Anschließend erfolgte der Austausch des Puffers gegen 5 ml Primärantikörperlösung, mit welcher der Blot über Nacht bei 4 °C auf einem Rollator inkubiert wurde. Am Folgetag wurde die Membran zunächst dreimal 10 min mit TBS/Tween-Puffer gewaschen. Darauf folgte die einstündige Inkubation mit 5 ml Sekundärantikörperlösung bei Raumtemperatur auf dem Rollator. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran mit TBS/Tween-Puffer konnte schließlich die Proteindetektion erfolgen.

3.2.2.5. Immunologische Proteindetektion

Die Membranen wurden in der Expositionskassette mit je 2 ml 1:1 gemischten Chemolumineszenz-Reagenzien gleichmäßig benetzt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase fungierte dabei als Katalysator für die Oxidation des Luminols, die mit einer Lichtemission verbunden war. In der Dunkelkammer erfolgte anschließend die Exposition autoradiographischer Filme gegenüber der aktivierten Chemolumineszenz. Nach der Entwicklung der Filme, die entweder manuell oder mittels Entwicklermaschine erfolgte, zeigten sich die zu detektierenden Proteine als geschwärzte Banden unterschiedlich starker Intensität in Abhängigkeit der an die Nitrocellulosemembran gebundenen Proteinmenge. Die entwickelten Filme wurden mit dem Programm Adobe Photoshop eingescannt. Die quantitative Auswertung der Proteinmengen bzw. des Phosphorylierungsgrades der Proteine erfolgte mit ImageJ. Es erfolgte stets eine Normierung der Proteinmengen auf das Loading-Kontrollprotein. Die graphische Auswertung der Ergebnisse in Form von Diagrammen wurde mit Microsoft Excel 2003 durchgeführt. Angegeben wurden die Mittelwerte mit SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism. Es wurde der gepaarte T-Test angewendet. Für die Signifikanzniveaus galten folgende Grenzwerte: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

3.2.2.6. Stripping

Für die Detektion weiterer Proteine mit ähnlichem oder gleichem Molekulargewicht wie das bereits detektierte auf derselben Membran mussten die alten Antikörperbindungen zunächst beseitigt werden. Dazu wurde ein die Membran enthaltendes 50 ml

Zentrifugenröhrchen mit im Wasserbad auf 50 °C erwärmtem Glycin–Stripping–Puffer aufgefüllt und dieses anschließend bei 50 °C und 150 rpm 30 min im Thermoschüttler inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen der Membran für je 30 min mit TBS/Tween–Puffer. Anschließend erfolgten eine erneute Blockierung unspezifischer Bindungen sowie Antikörperinkubation wie oben beschrieben. Da eine Änderung des Phosphorylierungsgrades von Proteinen während des Strippens nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, wurde dieses Verfahren nur genutzt, um nachfolgend ein spezielles Gesamtprotein oder ein Loading–Protein zu detektieren.

3.2.3. Durchflusszytometrie (FACS)

Der Einfluss der Stimulation auf Zellzahl und –größe wurde mittels FACS untersucht. Nach beendeter Stimulation wurden die 12–Well–Platten zunächst abgesaugt und kurz mit 1xTX gewaschen. Anschließend wurden die Platten 2 mal 2 min bei 37 °C mit 1xTX inkubiert. Die proteolytische Wirkung des Trypsins wurde dann durch die Zugabe von FACS–Puffer neutralisiert. Der Inhalt jedes Wells wurde mit einer 1000 µl Pipette mehrmals resuspendiert und anschließend in ein auf Eis stehendes FACS–Röhrchen überführt. Dieses enthielt außerdem Propidiumjodid (final 1 µg/ml), welches sich durch eine zunehmende Membrandysfunktion toter Zellen in diese einlagerte und dort mit der DNA interkalierte. In diesem Zustand fluoreszierte es deutlich stärker als in löslicher Form, sodass durch die Wahl eines entsprechenden Gates bei der späteren Messung die toten Zellen nicht mit berücksichtigt wurden. Abschließend wurden die Wells mit Trypsin–Sojabohneninhibitor gespült und dieser ebenfalls in das entsprechende FACS–Röhrchen überführt. Direkt vor der Messung wurde der Inhalt jedes FACS–Röhrchens nochmals gut durchmischt. Die Messung erfolgte unter Verwendung von Vorwärtsstreulicht (FSC–H). Dabei traf das Laserlicht in einem flachen Winkel auf die passierenden Zellen. Neben der Zellzählung wurde damit durch den Grad der Beugung auch die Größe der Zellen ermittelt. Da die Messgenauigkeit von der Geschwindigkeit der den Laser passierenden Zellen abhing, wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 200 Zellen pro Sekunde detektiert wurden. Die graphische Auswertung der Ergebnisse in Form von Diagrammen wurde mit Microsoft Excel 2003 durchgeführt. Angegeben wurden die Mittelwerte des Median FSC–H mit SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism. Es wurde der gepaarte T–Test angewendet. Für das Signifikanzniveau galt folgender Grenzwert: * $p < 0.05$.

3.2.4. Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert, stimuliert und anschließend mit Hilfe einer 4%igen Formaldehyd–PBS–Lösung fixiert (15 min Inkubation). Die weiteren Arbeitsschritte variierten je nach Art der zu detektierenden Proteine: Die Membranpermeabilisierung für Proteine des Zytoskeletts erfolgte mit 0.1% TritonX100 (3 min, Raumtemperatur). Unspezifische Proteinbindungen wurden über Nacht mit einer 1%igen BSA–PBS–Lösung bei 4 °C abgesättigt. Danach wurden die Deckgläser mit Alexa488–Phalloidin inkubiert (1:50 in 1% BSA–PBS–Lösung verdünnt, 30min). Phalloidin lagerte sich an Aktinfilamente an, die durch die Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden konnten. Bei membrangebundenen Proteinen erfolgte die Zellpermeabilisierung mit 100% Methanol (15 min, –20 °C). Für die Blockierung unspezifischer Proteinbindungen wurde 1% Ziegen Serum benutzt. Am Folgetag wurden die Deckgläser zunächst mit Primärantikörper–Lösung inkubiert (Akt, pAkt; 1:100 in 1% Ziegen Serum verdünnt, 2,5 Stunden). Anschließend erfolgte die Inkubation mit an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in 1% BSA – PBS–Lösung verdünnt, 15 Stunden). Danach wurden die Kerne mit DAPI angefärbt (1:1000 in 1% BSA–PBS–Lösung verdünnt, 20 min Inkubation). Abschließend wurden die Deckgläser mit Aqua–Poly/Mount auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt. Am Fluoreszenzmikroskop wurde mit dem 40er Objektiv gearbeitet.

Fluoreszenzfarbstoff	verwendet für	Wellenlänge Emissionsmaximum	emittiertes Licht
Alexa488	pAkt, Zytoskelett	519nm	grün
Alexa568	Akt	603nm	rot–orange
DAPI	DNA (Zellkern)	461nm	blau

Die Zellaufnahmen wurden mit Hilfe des Programms Axio Vision erstellt. Bei den membrangebundenen Proteinen betrug die Belichtungszeit 500 ms, die Aktinfilamente als Bestandteile des Zytoskeletts wurden 100 ms belichtet.

4. Ergebnisse

4.1. Nicht-genomische Effekte von E2

4.1.1. E2-Konzentrationsfindung

Die Akt-Kinase stellt ein bekanntes downstream Molekül der E2-vermittelten Signaltransduktion dar. Die Phosphorylierung an Ser473 ist ein Indikator für die Aktivität der Kinase. Um herauszufinden, welche E2-Konzentration in unseren weiblichen Kardiomyozyten die stärksten Phosphorylierung von Akt an Ser473 bewirkt, wählten wir 90 min Stimulationszeit und untersuchten E2-Konzentrationen von 1 nM bis 100 nM. Als Kontrollen dienten entsprechende Verdünnungen des Lösungsmittels von E2, Ethanol, sowie eine Probe ohne erneuten Medienwechsel am Stimulationstag (K). Parallel dazu wurde ein Westernblot für das bekannte Akt downstream target p70S6K durchgeführt. Bei einer E2-Konzentration von 10 nM war eine maximale Akt-Phosphorylierung zu sehen (Abb. 9a), sodass diese Konzentration in allen weiteren Versuchen eingesetzt wurde. Dies entsprach einer Verdünnung der Lösungsmittelkontrolle von 10^{-6} . Für p70S6K zeigte sich neben 10 nM auch bei 50 nM E2 eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung (Abb. 9b).

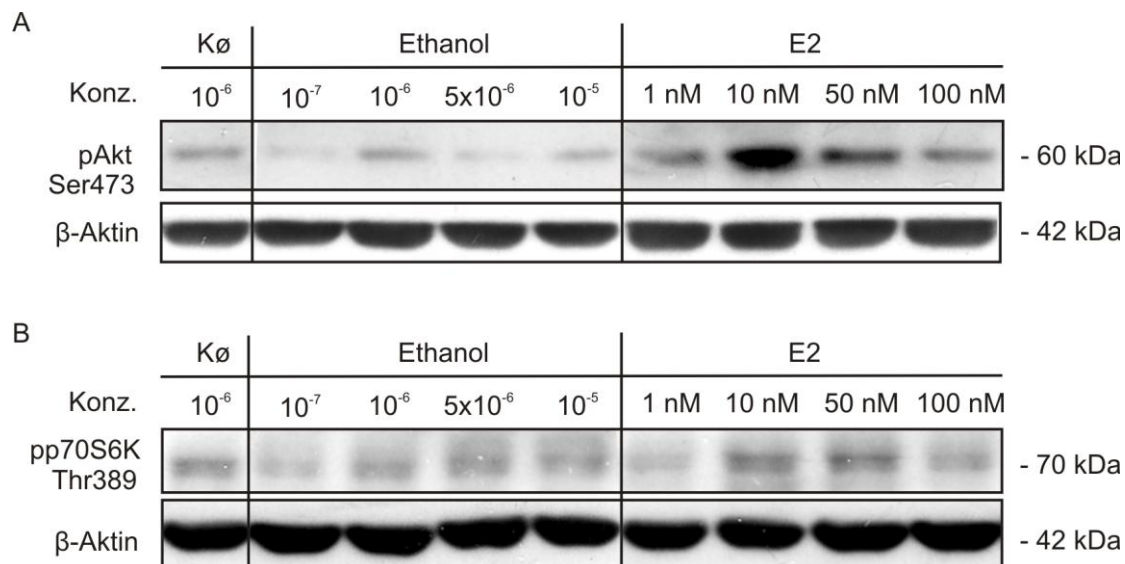


Abb. 9: Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von Akt an Ser473 (A) und p70S6K an Thr389 (B) durch E2 bzw. die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol).

Die Inkubationszeit betrug 90 min. Bei der Kontrolle Kø war kein erneuter Medienwechsel am Stimulationstag erfolgt.

4.1.2. Zeitabhängige Aktivierung und Deaktivierung von intrazellulären Signalmolekülen durch E2-induzierte Phosphorylierungen

Für die Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Aktivierung bzw. Deaktivierung intrazellulärer Signalmoleküle durch E2 wurden Zeitpunkte zwischen 5 min und 120 min gewählt und als Komponenten des Erk- und Akt/mTor-Signalweges die Phosphorylierungen von Erk an Thr202/Tyr204, Akt an Ser473, GSK3 α/β an Ser21/9, TSC2 an Ser939 und p70S6K an Thr389 mittels Westernblot bestimmt.

4.1.2.1. Erk-Aktivierung

Als Vertreter des MAPK-Signalweges ist Erk Teil eines Netzwerks, das zahlreiche intrazelluläre Prozesse beeinflusst. Mit den beiden Erk-spezifischen Phosphorylierungsstellen Thr421 und Ser424 wurde mit p70S6K neben TSC2 ein weiterer Angriffspunkt der Kinase in den Akt/mTor-Signalweg gefunden. Die E2-induzierte Erk-Aktivierung beschränkte sich auf die ersten 15min der Zellstimulation (Abb. 10). In diesem Zeitraum wurden an Thr202 und Tyr204 Phosphorylierungsstärken erreicht, die dem 16-fachen des Nullwertes entsprachen.

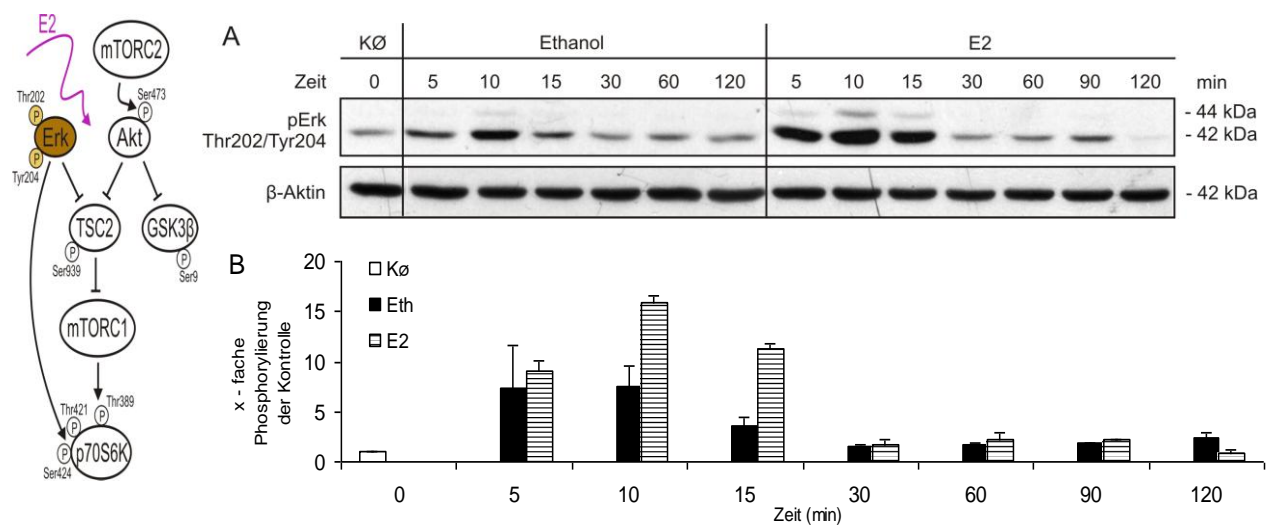


Abb. 10: Zeitabhängige Phosphorylierung von Erk an Thr202 und Tyr204 durch E2 bzw. die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol).

Der Westernblot (A) zeigt exemplarisch die unterschiedlichen Phosphorylierungsgrade von Erk an Thr202 und Tyr204 bei Inkubation der Zellen mit Ethanol (links) oder E2 (rechts) über einen Zeitraum von 5 bis 120 min. Bei der Kontrolle K \emptyset erfolgte eine Lysierung ohne erneuten Medienwechsel am Stimulationstag (Nullwert). Der untere Blot zeigt das Ladeprotein β -Aktin. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 3 Versuchen zusammen. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Die Werte wurden mittels β -Aktin normiert und jeweils auf den Nullwert

der einzelnen Versuche bezogen. Innerhalb der ersten 15 min induzierte E2 einen deutlichen Anstieg der Erk-Phosphorylierung. Auch bei der Lösungsmittelkontrolle zeigten sich erhöhte Werte, die aber weniger stark ausgeprägt waren.

4.1.2.2. mTORC2-/ Akt-Aktivierung

Die Akt-Phosphorylierung an Ser473 erfolgt durch den Kinasekomplex mTORC2 und ist bedeutsam für die volle Aktivität der Kinase. Daher wurde deren Phosphorylierung als Maß für die mTORC2-Aktivierung durch E2 genommen. Die E2-Stimulation führte zu den späten Zeitpunkten, 90 und 120 min, zu einem deutlichen Anstieg der Akt-Phosphorylierung (Abb. 11). Im Mittel war der Grad der Phosphorylierung nach 90 min dabei mehr als 8-mal so hoch wie der Nullwert.

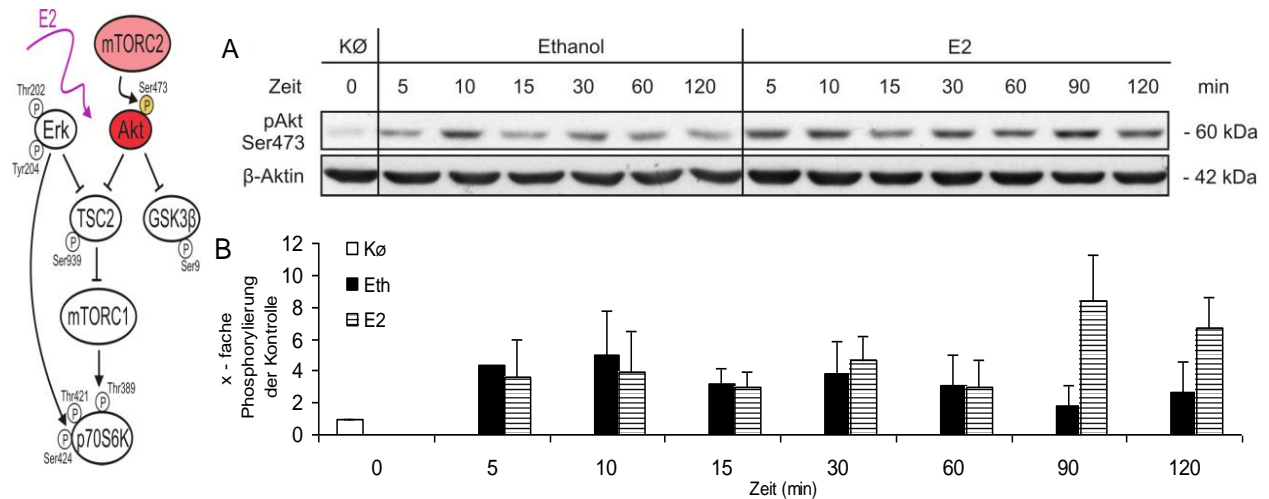


Abb. 11: Zeitabhängige Phosphorylierung von Akt an Ser473 durch E2 bzw. die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol).

Im Westernblot (A) zeigte sich bei E2-Stimulation zusätzlich zu den frühen Zeitpunkten, an denen es ebenso bei der Lösungsmittelkontrolle Ethanol zu einem Anstieg der Phosphorylierung von Akt an Ser473 kam, auch nach 90 bis 120 min eine verstärkte Phosphorylierung. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 3 Versuchen zusammen. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM (5 min Messung Lösungsmittel wurde nur bei 1 Experiment durchgeführt).

4.1.2.3. GSK3α/β-Deaktivierung

Ein bekanntes Zielprotein von Akt stellt GSK3 dar, wobei insbesondere der β-Isoform ein antihypertropher Effekt in Kardiomyozyten zugeschrieben wird. Die Phosphorylierung der Kinase an Ser21 (GSK3α) bzw. Ser9 (GSK3β) führt dabei zu ihrer Inaktivierung. In unseren Versuchen ergab sich für die beiden Isoformen im Zeitverlauf

eine vergleichbare Phosphorylierungsstärke (Abb. 12). E2 führte nahezu über den gesamten Zeitverlauf zu einer verstärkten Phosphorylierung von GSK3. Eine deutliche Zunahme zeigte sich ab 30 min.

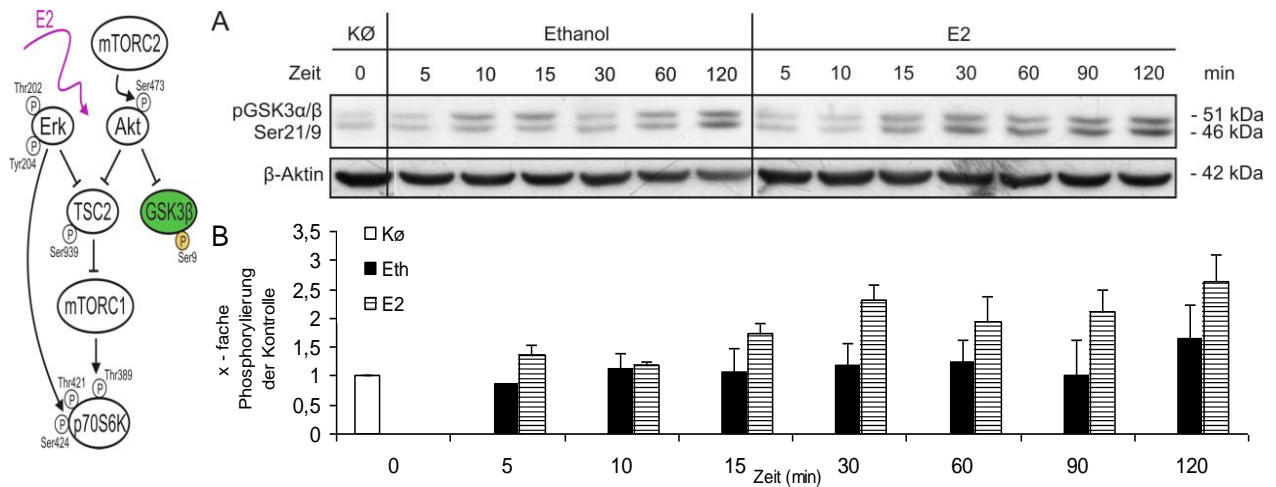


Abb. 12: Zeitabhängige Phosphorylierung von GSK3α an Ser21 und GSK3β an Ser9 durch E2 bzw. die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol).

Im Westernblot (A) erkennt man im Zeitverlauf für E2 eine verstärkte Phosphorylierung der beiden GSK3-Isoformen sowohl gegenüber dem Nullwert KØ als auch den Lösungsmittelkontrollen Ethanol. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 3 Versuchen zusammen. Aufgrund des annähernd gleichen Phosphorylierungsgrades wurden die Werte der beiden GSK-Isoformen addiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM (5 min Messung Lösungsmittel wurde nur bei 1 Experiment durchgeführt).

4.1.2.4. TSC2–Deaktivierung

TSC2 stellt ein direktes Substrat sowohl von Akt als auch von Erk dar. In seinem aktiven, unphosphorylierten Zustand bewirkt es eine Hemmung der Kinaseaktivität des mTORC1-Komplexes. Um zu überprüfen, ob unter dem Einfluss von E2 weiter downstream von Akt auch TSC2 phosphoryliert wird, führten wir Westernblots mit phosphospezifischen TSC2-Antikörpern durch. Tatsächlich war der Zeitverlauf für späte Zeitpunkte vergleichbar dem der Akt-Aktivierung mit einem Anstieg der Phosphorylierung nach 90 und 120 min bei E2-Stimulation (Abb. 13). Zudem trat eine verstärkte Phosphorylierung bereits bei 15 min und 30 min auf, die eher mit der E2-induzierten Erk-Aktivierung korrelieren.

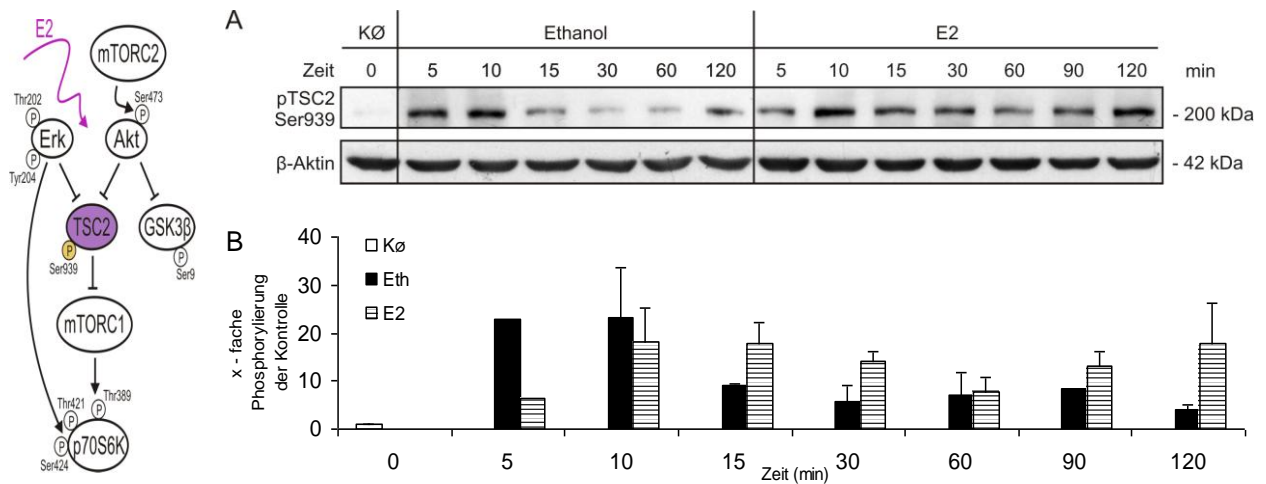


Abb.13: Zeitabhängige Phosphorylierung von TSC2 an Ser939 durch E2 bzw. die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol).

Im Western Blot (A) zeigen sich bei E2–Stimulation zwei Phosphorylierungsspitzen: Eine frühe nach 10min sowie eine späte nach 120min. In dem Diagramm (B) wurden die Ergebnisse von 2 Versuchen zusammengefasst. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM (5min Messung Lösungsmittel und E2 sowie 90min Messung bei Lösungsmittel wurde nur bei 1 Experiment durchgeführt).

4.1.2.5. mTORC1– /p70S6K–Aktivierung

Die Inaktivierung von TSC2 durch seine Phosphorylierung hebt den inhibierenden Effekt auf mTORC1 auf. Dessen erhöhte Aktivität äußert sich unter anderem durch Zunahme der Phosphorylierung von p70S6K, einer downstream Kinase von mTORC1, an Thr389. Bei E2–Stimulation ließen sich eine frühe, geringfügig verstärkte Phosphorylierung nach 15 min sowie eine späte, deutlich ausgeprägte Verstärkung nach 90 min feststellen (Abb. 14). Besonders die Bandenintensitäten der Lösungsmittelkontrollen waren zum Teil deutlichen Schwankungen unterworfen.

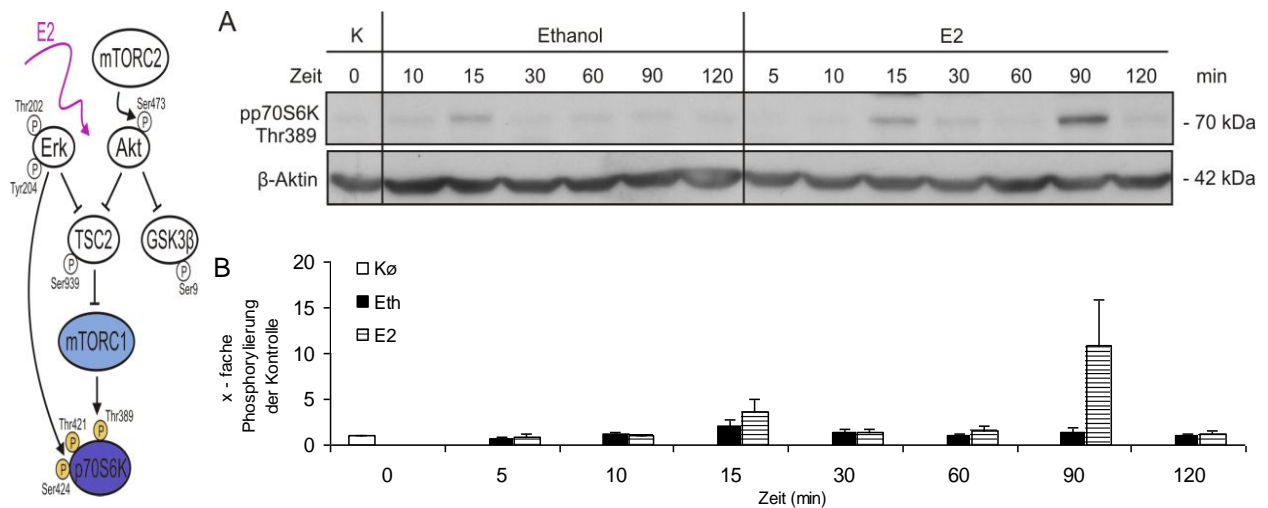


Abb.14: Zeitabhängige Phosphorylierung von p70S6K an Thr389 durch E2 bzw. die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol).

Die Zunahme der Phosphorylierung von p70S6K an Thr389 bei E2-Stimulation, wie sie im Westernblot (A) nach 15 min und 90 min zu sehen ist, konnte in anderen Versuchen wiederholt werden: Im Diagramm (B) wurden die Ergebnisse von 4 Versuchen zusammengefasst. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM (5 min Messung Lösungsmittel wurde nur bei 2 Experimenten durchgeführt). Es bestätigt sich die deutlichste Zunahme der Phosphorylierung nach 90 min E2-Stimulation.

Zusammenfassend zeigte sich in den Kurzzeitversuchen, dass E2 zu einer frühen Aktivierung von Erk (maximale Stimulation nach 10 bis 15 min) führt, während die mTORC2-induzierte Aktivierung von Akt erst zu den späten Zeitpunkten (um 90 min) beobachtet werden konnte. Für TSC2 und p70S6K als downstream targets beider Kinasen zeigte sich unter dem Einfluss von E2 neben einer geringen Zunahme der frühen Phosphorylierung (nach 15 bis 30 min) ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung zu den späten Zeitpunkten (nach 90 bis 120 min).

4.1.3. Abhängigkeit der E2-vermittelten Aktivierung des Erk- und Akt/mTor-Signalweges von den Östrogenrezeptoren (ER)

Um zu untersuchen, ob die E2-Effekte auf die Aktivierung von Erk und der Akt/mTOR-Signalkaskade ER-abhängig sind, wurden Experimente mit dem ER-Inhibitor ICI182,780 durchgeführt. Als Lösungsmittelkontrollen wurde DMSO in den jeweiligen konzentrationsentsprechenden Verdünnungen eingesetzt.

4.1.3.1. Effekte unterschiedlicher Konzentrationen des ER-Inhibitors ICI182,780 auf die Akt-Phosphorylierung

Im ersten Schritt wurden verschiedene Konzentrationen von ICI182,780 hinsichtlich deren Einfluss auf die E2-induzierte Aktivierung von Akt getestet. Abb. 15 zeigt einen repräsentativen Westernblot mit Effekten von ICI182,780 auf pAkt Ser473 nach 90 min Stimulation mit 10 nM E2. Links dargestellt ist die Lösungsmittelkontrolle zur E2-Stimulation, rechts die E2-stimulierten Proben. E2 führte unabhängig von den unterschiedlichen Lösungsmittelkontrollkonzentrationen zu einem Anstieg der Akt-Phosphorylierung. Diese wurde bei allen Konzentrationen von ICI182,780 reduziert, am deutlichsten bei 10 μ M. Daher wurde für die weiteren Experimente mit E2 diese Konzentration von ICI182,780 eingesetzt.

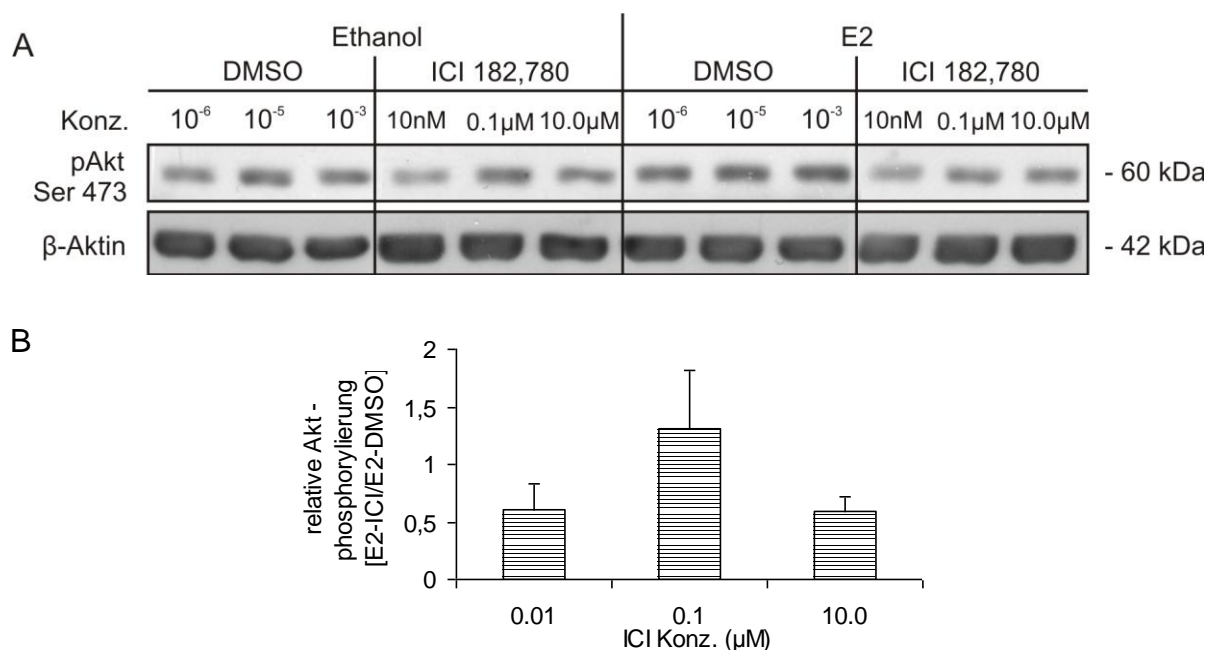


Abb. 15: E2- bzw. Lösungsmittelkontrollen (Ethanol)-induzierte Phosphorylierung von Akt an Ser473 und konzentrationsabhängige Reduktion der Effekte durch den ER-Blocker ICI182,780. Der Westernblot (A) zeigt, dass E2 auch in Gegenwart des Lösungsmittels von ICI182,780 (DMSO) zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt an Ser473 führte. Die Zunahme der Akt-Phosphorylierung wurde durch alle eingesetzten ICI182,780-Konzentrationen reduziert. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 3 Versuchen zusammen. Es zeigt die ICI182,780-induzierte Reduktion der Akt-Phosphorylierung durch E2. Die höchste Konzentration des ER-Blockers ergab die stärkste Reduktion der E2-induzierten Akt-Phosphorylierung mit dem niedrigsten SEM. Es wurden die Werte für ICI E2-Stimulation durch DMSO E2-Stimulation dividiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM.

4.1.3.2. Zeitabhängige Effekte von 10 μM ICI182,780 auf die E2–vermittelte Aktivierung des Erk– und Akt/mTor–Signalweges

In den Versuchen zur geeigneten Konzentrationsfindung von ICI182,780 war die Beobachtung gemacht worden, dass die verschiedenen Konzentrationen des Lösungsmittels von ICI182,780, DMSO, Einfluss auf die Stärke der E2–induzierten Akt–Phosphorylierung hatten. Deswegen untersuchten wir zunächst, wie sich die von uns gewählte Konzentration von 10 μM ICI182,780 bzw. 10^{-3} DMSO ohne zusätzliche E2–Stimulation auf die Phosphorylierung der Moleküle des Akt/mTor–Signalweges, Akt an Ser473, TSC2 an Ser939 und p70S6K an Thr389, auswirkte. Dazu erfolgte eine 60 min Inkubation der Zellen mit ICI182,780 oder seinem Lösungsmittel DMSO. Abb. 16 zeigt die Ergebnisse: Die Inkubation mit ICI182,780 führte zu einer basalen Hemmung der Akt– und TSC2–Phosphorylierung, hatte dagegen keinen Einfluss auf die basale Phosphorylierung von p70S6K.

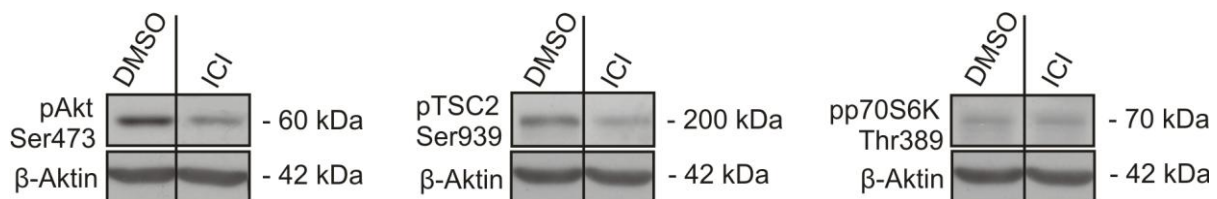


Abb. 16: Einfluss von ICI182,780 und seinem Lösungsmittel DMSO auf die Phosphorylierung der Proteine der Akt/mTor–Signalkaskade.

Die Westernblots zeigen die Proteinphosphorylierungen für Akt an Ser473 (links), TSC2 an Ser939 (Mitte) und p70S6K an Thr389 (rechts) nach 60 minütiger DMSO– (jeweils links) bzw. ICI182,780–Inkubation (jeweils rechts). Die deutlich stärkere Phosphorylierung von Akt nach DMSO–Behandlung gegenüber ICI182,780 war für die p70S6K–Phosphorylierung nicht mehr nachweisbar. Die unteren Blots zeigen das entsprechende Ladeprotein der oberen Banden.

Für die Untersuchung der Reduzierbarkeit der E2–induzierten Phosphorylierung durch den ER–Blocker ICI182,780 wurden im Anschluss an die Präinkubation mit 10 μM ICI182,780 bzw. 10^{-3} DMSO Zeitpunkte zwischen 30 min und 120 min für die Stimulation mit E2 bzw. der Lösungsmittelkontrolle Ethanol gewählt. Anschließend wurden im Westernblot als Komponenten des Erk– und Akt/mTor–Signalweges die Phosphorylierungen von Erk an Thr202/Tyr204, Akt an Ser473, GSK3 α/β an Ser21/9, TSC2 an Ser939 und p70S6K an Thr389 bestimmt.

Reduktion der E2-induzierten Erk-Aktivierung durch ICI182,780

In Gegenwart des Lösungsmittels DMSO führte E2 nach 30 min zur stärksten Erk-Aktivierung. Im weiteren Zeitverlauf nahm diese ab. Die verstärkte Phosphorylierung war durch ICI182,780 reduzierbar (Abb. 17).

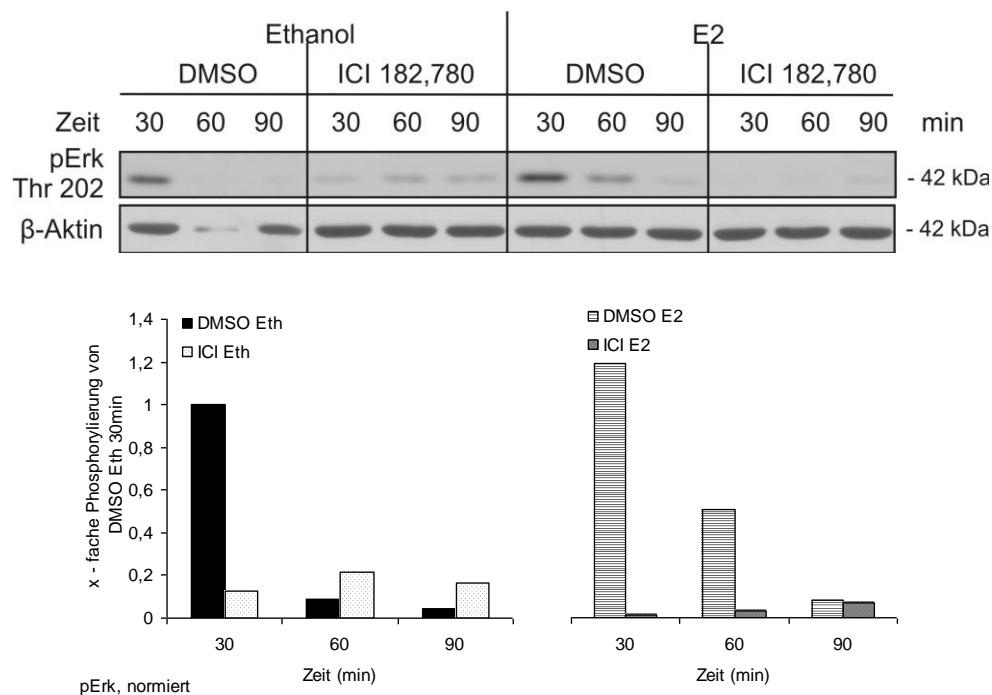


Abb. 17: Zeitabhängige Reduktion der E2-induzierten Erk-Phosphorylierung an Thr202 durch ICI182,780.

Der Westernblot (oben) zeigt den typischen Zeitverlauf der E2-induzierten Erk-Aktivierung mit einem frühen Phosphorylierungsmaximum bereits nach 30 min. Die Präinkubation der Zellen mit ICI182,780 führte zu einer deutlichen Reduktion des Effekts. Das Diagramm (unten) zeigt die auf β -Aktin normierten Werte dieses Versuchs. Dabei entspricht der nach 30 min gemessene Wert der Lösungsmittelkontrolle [DMSO Ethanol] 1.

Reduktion der E2-induzierten mTORC2-/ Akt-Aktivierung durch ICI182,780

Auch bezüglich der Aktivierung von Akt durch E2 wiederholten sich die Beobachtungen, die bereits bei den Versuchen ohne das zusätzliche Lösungsmittel von ICI182,780 gemacht worden waren: Die stärkste Aktivierung erfolgte nach 120 min E2-Inkubation. Die E2-abhängige Akt-Phosphorylierung war zu jedem Beobachtungszeitpunkt der Zeitreihe durch ICI182,780 reduzierbar (Abb. 18). Die stärkste Hemmung ließ sich ebenfalls nach 120 min Stimulationsdauer beobachten.

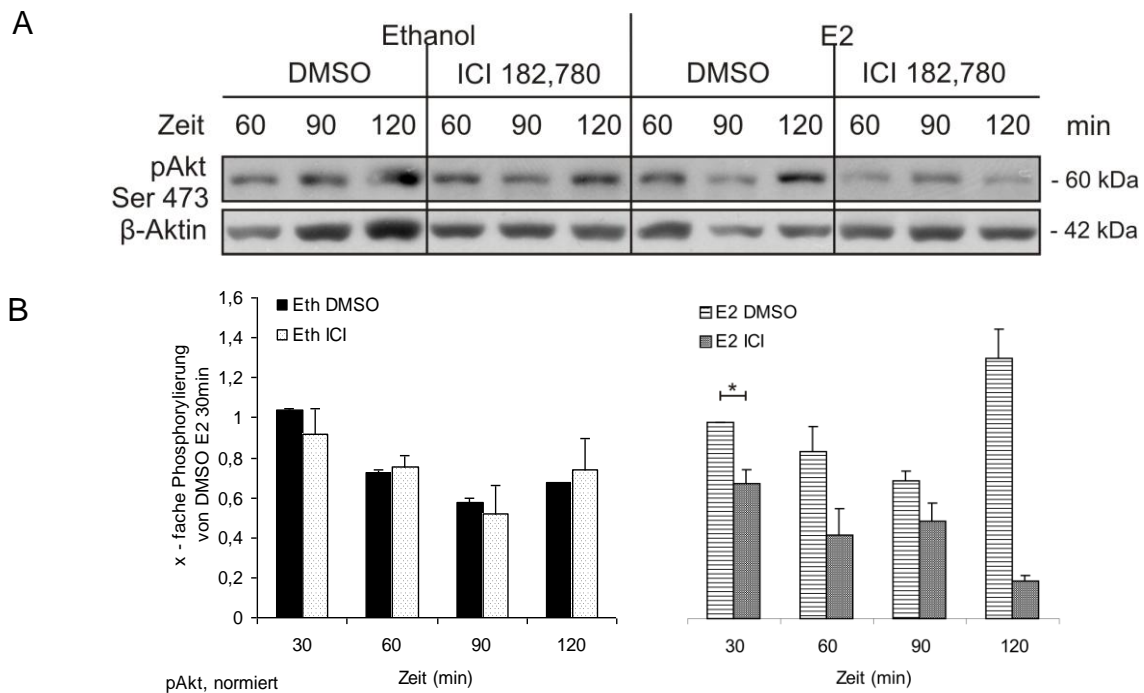
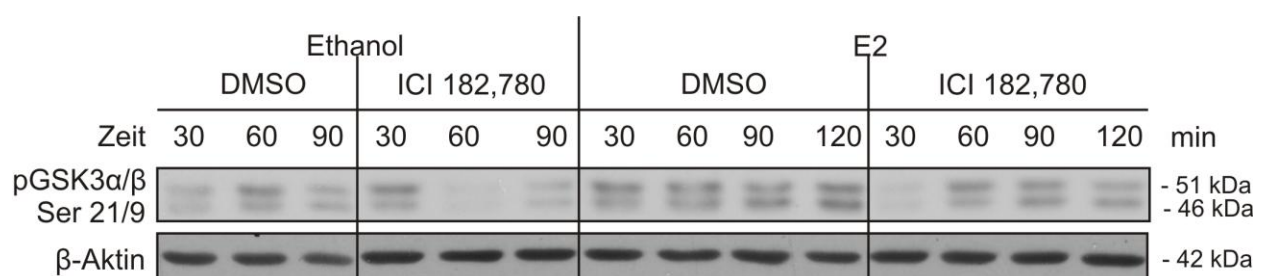


Abb. 18: Zeitabhängige Reduktion der E2-induzierten Akt-Phosphorylierung an Ser473 durch ICI182,780.

Der Westernblot (A) zeigt die Phosphorylierung von Akt durch E2 mit einem Maximum bei 120 min sowie die Effekte der ER-Inhibition zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die inhibitorische Wirkung von ICI182,780 bei den E2-stimulierten Proben war zu jedem Zeitpunkt erkennbar, maximal bei 120 min, wo der Wert sogar unter Basalniveau gesenkt wurde. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 5 Versuchen zusammen. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Die Werte wurden auf β -Aktin normiert und für jeden Versuch jeweils auf die mit DMSO präinkubierten, 30 min mit E2 stimulierten Zellen bezogen.

Reduktion der E2-induzierten GSK3 α / β -Deaktivierung durch ICI182,780

Es zeigte sich erneut die verstärkte GSK-Phosphorylierung bei E2-Stimulation im Zeitraum von 30 bis 120 min. Eine Vorbehandlung mit ICI182,780 führte zu allen Beobachtungszeitpunkten zu einer Abschwächung des Effektes (Abb. 19).



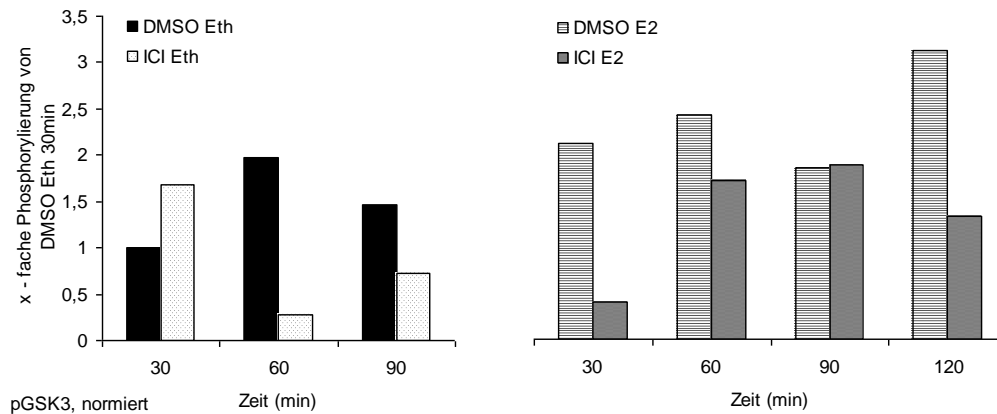


Abb. 19: Zeitabhängige Reduktion der E2-induzierten GSK3 α/β -Phosphorylierung an Ser21/9 durch ICI182,780.

In dem Westernblot (oben) ist die E2-induzierte verstärkte GSK3-Phosphorylierung über den gesamten Beobachtungszeitraum erkennbar. Die ICI182,780-Präinkubation vor E2-Stimulation führte zu einer zum Teil deutlichen Verringerung der Bandenintensitäten. Das Diagramm (unten) zeigt die auf β -Aktin normierten Werte dieses Versuchs. Dabei entspricht der nach 30 min gemessene Wert der Lösungsmittelkontrolle [DMSO Ethanol] 1.

Reduktion der E2-induzierten TSC2-Deaktivierung durch ICI182,780

Die Phosphorylierung von TSC2 an Ser939 zeigte bei E2-Stimulation erneut einen Anstieg zu den späten Zeitpunkten mit einem Maximum nach 90 min. Die verstärkte Phosphorylierung war durch ICI182,780 reduzierbar (Abb. 20).

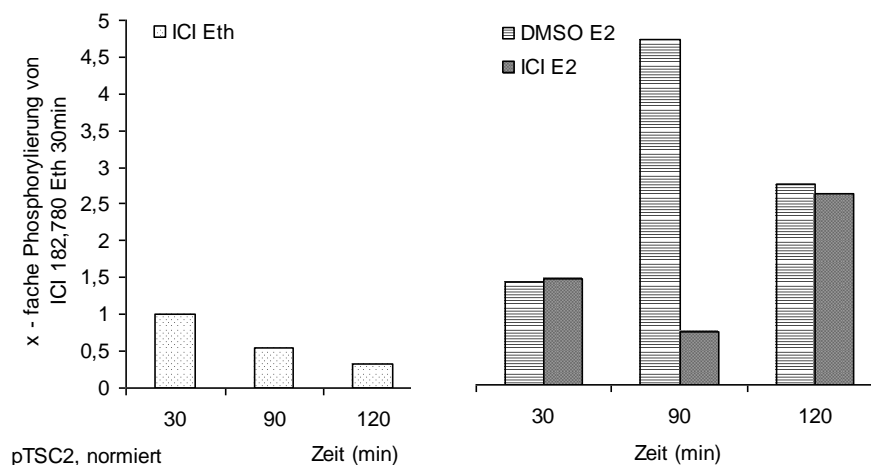
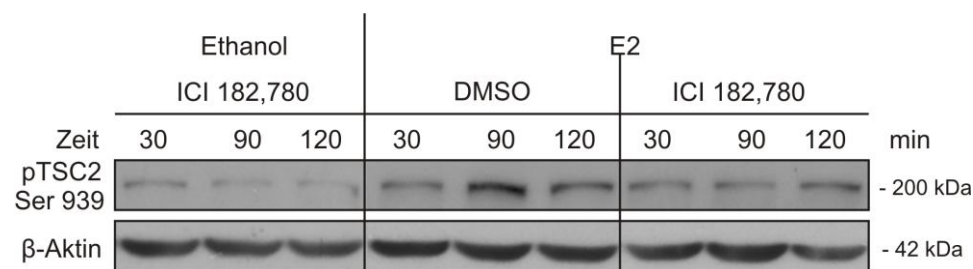


Abb. 20: Zeitabhängige Reduktion der E2-induzierten TSC2-Phosphorylierung an Ser939 durch ICI182,780.

Der Westernblot (oben) zeigt einen Anstieg der Phosphorylierung von TSC2 an Ser939 nach 90 bis 120 min E2-Stimulation (Mitte). Die Präinkubation mit ICI182,780 führte zu einer Reduktion der Bandenintensitäten (rechts). Links zu sehen ist der basale Effekt, den eine Präinkubation mit ICI182,780 auf nicht-E2-stimulierte Zellen hatte: Der Phosphorylierungsgrad von TSC2 blieb über den gesamten Zeitverlauf konstant niedrig. Das Diagramm (unten) zeigt die auf β -Aktin normierten Werte dieses Versuchs. Dabei entspricht der nach 30 min gemessene Wert der mit ICI182,780 präinkubierten, mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelten Zellen 1.

Reduktion der E2-induzierten p70S6K-Aktivierung durch ICI182,780

Die Phosphorylierung von p70S6K an Thr389 war zwischen den einzelnen Versuchen stärkeren Schwankungen unterworfen. Erneut kam es zu einer E2-induzierten Zunahme der Phosphorylierung von p70S6K an Thr389. Dabei lag das Phosphorylierungsmaximum zum Teil bereits nach 30 min vor, in anderen Versuchen hingegen erst wie gewohnt nach 90 bis 120 min. Die Präinkubation mit ICI182,780 führte hierbei zu einer Reduktion des Phosphorylierungsgrades (Abb. 21).

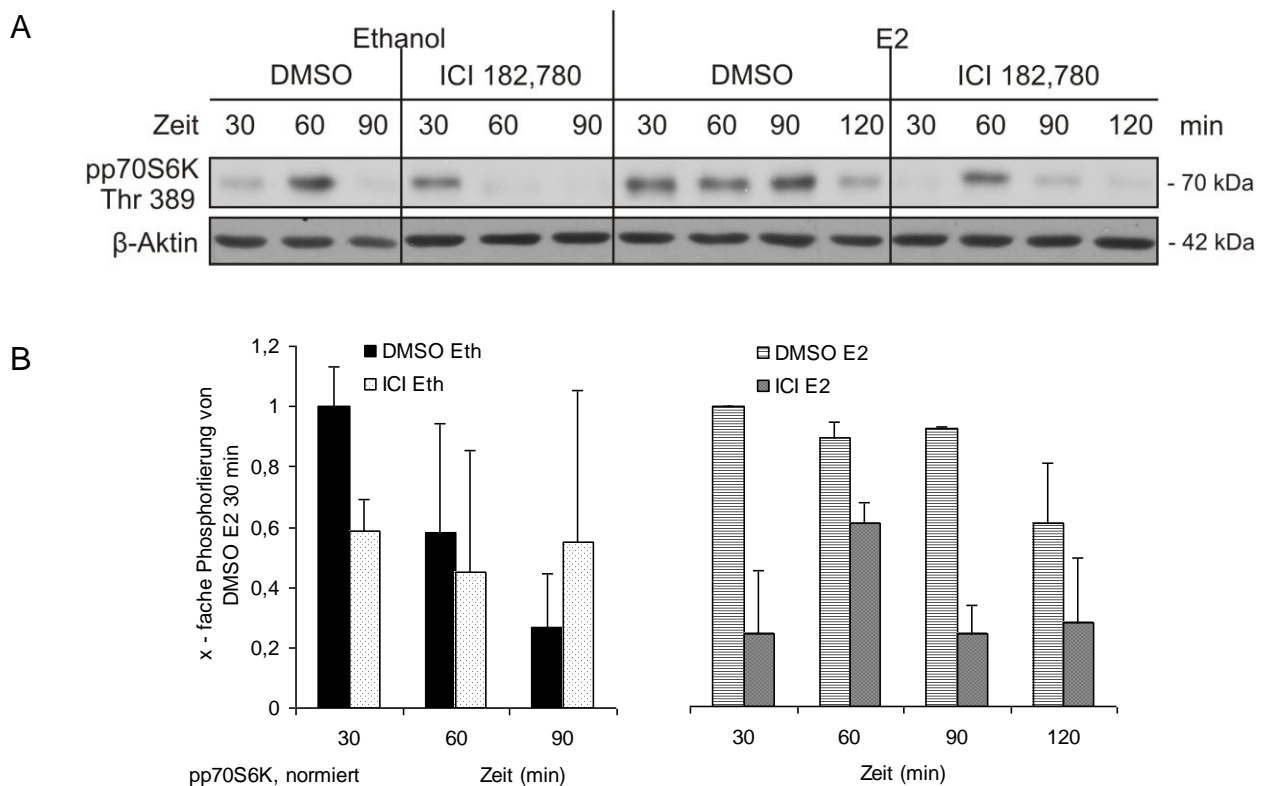


Abb. 21: Zeitabhängige Reduktion der E2-induzierten p70S6K-Phosphorylierung an Thr389 durch ICI182,780.

Der Westernblot (A) zeigt die besonders nach 30 und 90 min durch E2 induzierte starke Phosphorylierung von p70S6K an Thr389. Der Effekt war durch ICI182,780-Präinkubation deutlich reduzierbar und ging auf das zeitlich entsprechende Lösungsmittel-Niveau zurück. In dem Diagramm (B) wurden die Ergebnisse von 3 Versuchen zusammengefasst. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Die dargestellten Werte wurden auf β -Aktin normiert und anschließend für die einzelnen Versuche jeweils auf den Phosphorylierungsgrad der mit E2 stimulierten Zellen nach 30 min bezogen. Die besonders bei den lösungsmittelbehandelten Zellen hohen SEM lassen die starken Schwankungen der Ergebnisse der einzelnen Versuche erkennen.

Zusammenfassend wiederholten sich auch bei Verwendung von DMSO als zusätzliches Lösungsmittel von ICI182,780 die bereits beobachteten Kurzzeiteffekte von E2. Die Präinkubation der Zellen mit dem ER-Antagonist ICI182,780 führte zu einer Reduktion der Effekte, sodass die Kurzzeitwirkungen von E2 auf den Akt/mTor-Signalweg als ER-vermittelt angesehen werden können.

4.2. Modulation des Akt/mTor-Signalweges durch E2 bei adaptiver Langzeitstimulation mit IGF-1

Eine etablierte Modellsubstanz der adaptiven Herzmuskelhypertrophie stellt IGF-1 dar: Klassischerweise führt IGF-1 über eine Stimulation des IGF-1-Rezeptors tyrosinkinasevermittelt unter anderem zu einer Aktivierung von Akt¹¹⁵. Über welche Kinasen E2 allerdings die Signalkaskade in Kardiomyozyten moduliert, war bisher weitestgehend unbekannt. Um diese Fragen zu klären wurden Zellen mit IGF-1 ohne und in Gegenwart von E2 für 2 bzw. 1x 24 Stunden stimuliert, die Hypertrophie mittels FACS-Analyse bestimmt und die Signaltransduktion durch Westernblots und Immunzytochemie untersucht. Zur Analyse der Bedeutung von E2 und des Erk-Signalweges wurden Inhibitoren für E2 (ICI187,280) und Erk (PD184352) eingesetzt.

4.2.1. Regulation des Akt/mTOR-Signalweges durch E2 bei adaptiver Langzeitstimulation mit IGF-1 und Rolle der Erk-Kinase

Wie E2 den Akt/mTOR-Signalweg unter adaptiven hypertrophen Bedingungen reguliert und welche Rolle die Erk-Kinase dabei spielt, untersuchten wir, indem wir die Effekte einer Langzeitstimulation mit IGF-1 und E2 auf die Phosphorylierung von Akt und p70S6K in Abwesenheit und Gegenwart von PD184352 prüften. Dabei handelt es sich

um einen MAPKK1/2–Inhibitor, der die Phosphorylierung von Erk1/2 allosterisch blockiert, sodass die Kinase in ihrem inaktiven Zustand vorliegt¹¹⁶. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in den jeweiligen konzentrationsentsprechenden Verdünnungen eingesetzt.

Darüber hinaus wurde der ER-Blocker ICI182,780 eingesetzt. Leider waren die Ergebnisse dieser Versuche zum Teil erheblichen Schwankungen unterworfen, sodass eine abschließende Aussage zur Abhängigkeit der E2–vermittelten Langzeiteffekte auf die untersuchten Signalproteine von den ER leider nicht möglich war.

4.2.1.1. Konzentrationsfindung für PD184352 zur effektiven Inhibition von Erk

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener PD–Konzentrationen auf die E2–induzierte Aktivierung von Erk getestet. Abb. 22 zeigt zwei repräsentative Westernblots mit Effekten von PD184352 auf pErk Thr202/Tyr204 nach 72 Stunden Stimulation mit 10 nM E2. Im rechten Blot erfolgte eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit IGF–1. Links dargestellt ist jeweils die Lösungsmittelkontrolle DMSO, rechts die PD–behandelten Proben. Alle eingesetzten PD–Konzentrationen führten zu einer Reduktion der Erk–Phosphorylierung, auch bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IGF–1. Die deutlichste Reduktion konnte für die höchste eingesetzte Konzentration beobachtet werden, sodass für die weiteren Experimente eine PD–Konzentration von 1 μ M verwendet wurde.

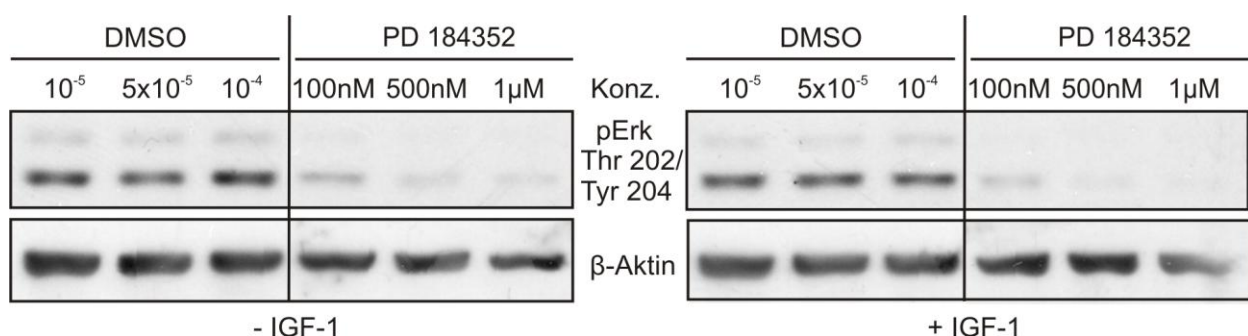


Abb. 22: Konzentrationsabhängige Reduktion der Erk–Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 durch PD184352.

Die Westernblots zeigen eine deutliche Reduktion der Erk–Phosphorylierung durch PD184352 (im Blot rechts) gegenüber der Lösungsmittelbehandlung (im Blot links) nach 72–stündiger Inkubation mit E2. Während der letzten 24 Stunden war bei einem Teil der Zellen zusätzlich eine Stimulation mit IGF–1 erfolgt (rechter Blot).

4.2.1.2. Effekte von 1 μM PD184352 auf ausgewählte Kinasen des Erk- und Akt/mTor-Signalweges

Erk-Phosphorylierung

Weder die Langzeitstimulation der Zellen mit IGF-1 (24 h) noch mit E2 (72 h) führte zu einer Veränderung des Phosphorylierungsgrades von Erk an Thr202/Tyr204. Abb. 23 zeigt, dass die Inkubation mit PD184352 (24 h) unabhängig von zusätzlichen Stimulationen die Erk-Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 bei unveränderter Erk-Gesamtproteinexpression deutlich reduzierte.

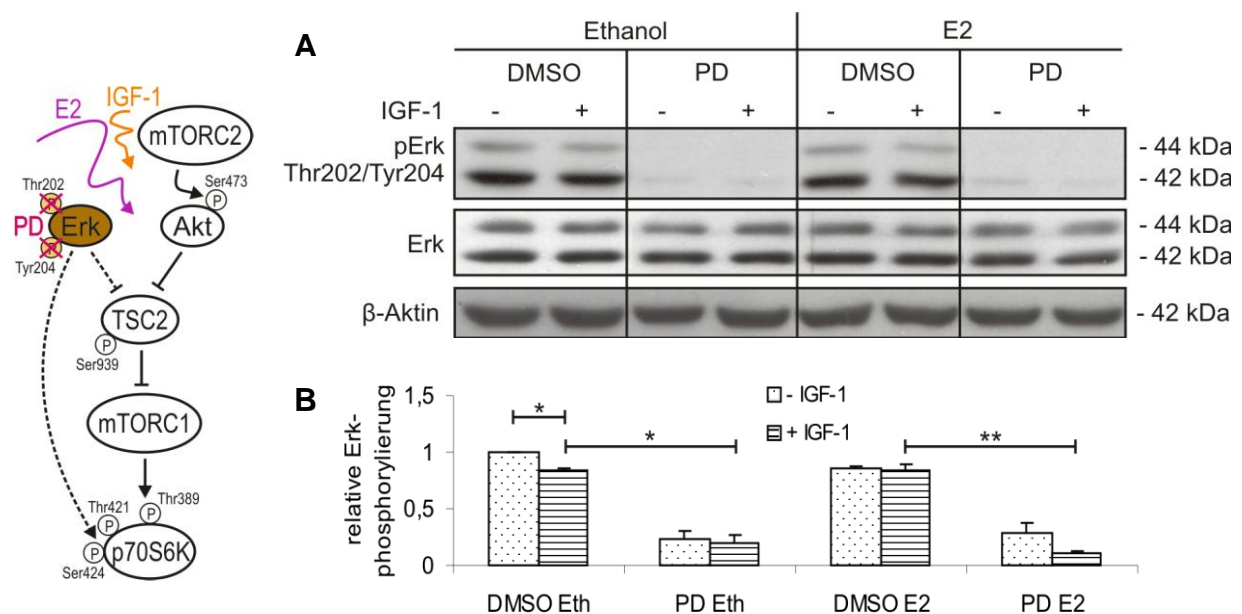


Abb. 23: Reduktion der Erk-Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 durch PD184352 unter physiologischen hypertrophen Bedingungen sowie E2-Stimulation.

Der Westernblot (A) zeigt exemplarisch die Hemmung der Erk-Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 durch 1 μM PD184352 (24 h) unter dem Einfluss von 10 nM E2 (72 h) und 10 nM IGF-1 (24 h) bzw. entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Die Gesamtproteinexpression von Erk blieb unabhängig von der unterschiedlichen Behandlung der Zellen gleich. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 6 Versuchen zusammen. Dabei entspricht [Ethanol DMSO – IGF-1] dem Wert 1. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Akt-Phosphorylierung

Auf Zellsignalebene führte die IGF-1-Stimulation zu einem deutlichen Anstieg der Akt-Phosphorylierung an Ser473. Unter dem Einfluss von E2 wirkte sich eine zusätzliche Hemmung der Erk-Aktivität in einer Zunahme der Akt-Phosphorylierung aus. Der Effekt trat besonders unter adaptiven hypertrophen Bedingungen auf (Abb. 24a, b). Die

simultane IGF-1-Stimulation führte sowohl bei den E2- als auch bei den lösungsmittelbehandelten Zellen zu einem deutlichen Anstieg von nukleär-lokalisiertem Akt. Auch eine gleichzeitige Erk-Blockade hatte keinen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von Akt: Die Kinase lag stets vorwiegend nukleär lokalisiert vor (Abb. 24c).

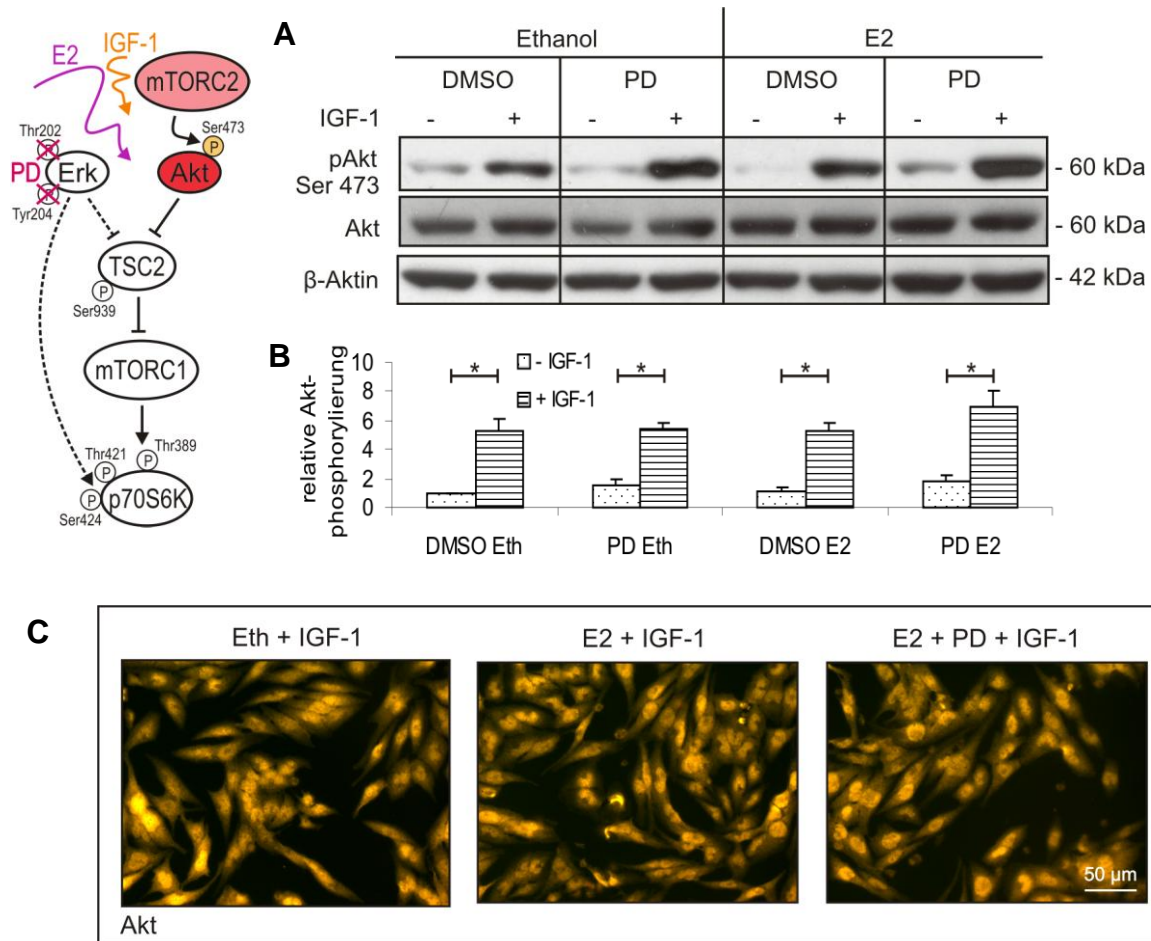


Abb. 24: Zunahme der Akt-Phosphorylierung an Ser473 (A, B) sowie intrazelluläre Akt-Verteilung (C) durch E2-Stimulation bei Hemmung der Erk-Aktivität unter physiologischen hypertrophen Bedingungen.

Der Westernblot (A) zeigt deutlich die Zunahme der Akt-Phosphorylierung an Ser473 bei Stimulation der Zellen mit IGF-1. Die stärkste Bande ergab sich bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit E2 sowie PD184352. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 6 Versuchen zusammen. Bei Erk-Blockade zeigte sich auch bei den basal behandelten Zellen eine Zunahme der Akt-Phosphorylierung durch E2, deutlicher trat der Effekt unter dem Einfluss von IGF-1 auf. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. * $p < 0.05$. Die Immunfluoreszenzfärbung (C) für Akt wurde mit dem fluorfarbstoffgekoppelten Sekundäntikörper Alexa568 durchgeführt.

In der Immunfluoreszenzfärbung war unter basalen E2-Kulturbedingungen (keine zusätzliche hypertrophe Stimulation der Zellen) ein deutlicher Anstieg von nukleär-

lokalisiertem Akt gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erkennbar. Dieser ließ sich bei vorheriger Blockade der ER auf das Lösungsmittelniveau reduzieren (Abb. 25).

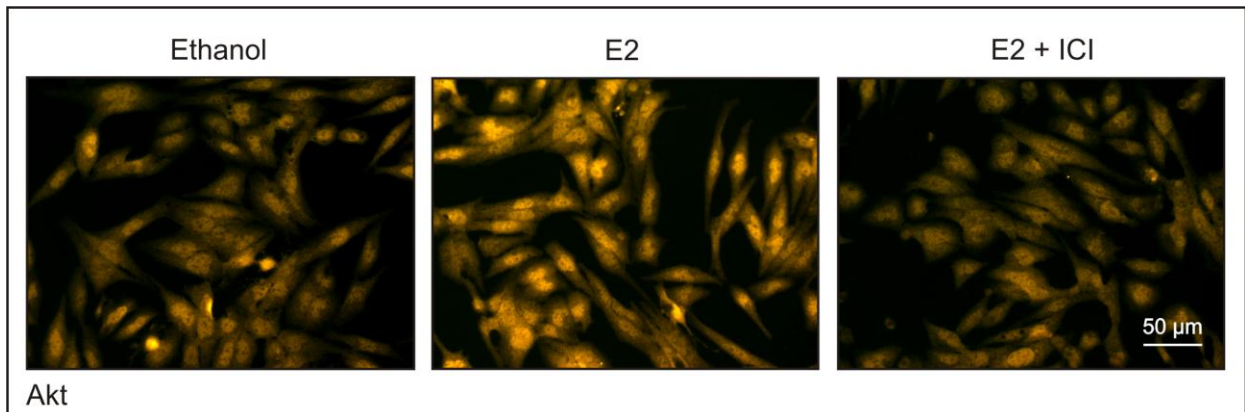


Abb. 25: Abhängigkeit der E2-induzierten Zunahme der nukleären Akt-Lokalisation von ER.

Für die adaptiv-hypertrophe Stimulation der Zellen mit IGF-1 wiederholten sich die in den Versuchen mit dem Erk-Blocker PD184352 beobachteten Ergebnisse im Sinne eines Anstiegs von nukleär-lokalisiertem Akt sowohl unter zusätzlicher E2- als auch Lösungsmittelbehandlung der Zellen. Bei E2-Stimulation führte eine vorherige Blockade der ER zu einer Reduktion von Akt im Zellkern (Abb. 26).

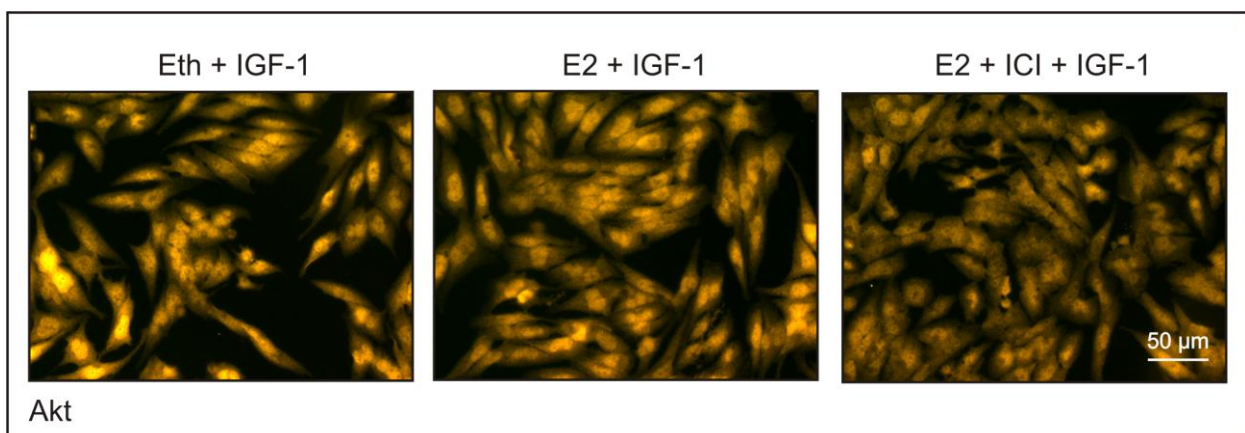


Abb.26: Deutliche nukleäre Akt-Anreicherung bei IGF-1-Stimulation sowie Reduktion bei ER-Blockade vor E2-Stimulation.

Um zu sehen, ob eine Hemmung von pErk ohne zusätzliche IGF-1-Stimulation funktionell mit Veränderungen der intrazellulären Akt-Lokalisation verbunden ist, wurden weitere immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Bei den Zellen ohne zusätzliche hypertrophe Stimulation führte eine Erk-Blockade bereits bei den lösungsmittel-behandelten Zellen zu einem Anstieg von nukleär lokalisiertem Akt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Erk bereits unabhängig von E2 basal eine hemmende

Funktion auf die Akt-Aktivierung ausübt. Unter E2-Kulturbedingungen erbrachte eine Erk-Blockade einen stärkeren Anstieg von pAkt Ser473 im Zellkern (Abb. 27).

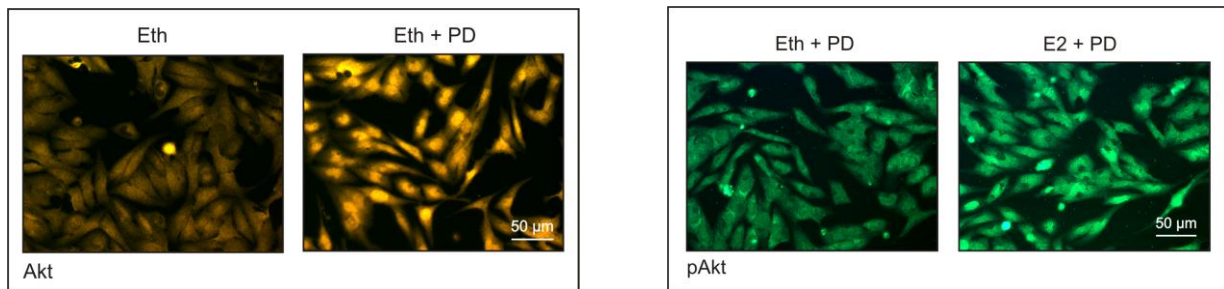


Abb. 27: Verstärkung von nukleär-lokalisiertem Akt (links) und pAkt Ser473 (rechts) bei Blockade des Erk-Signalweges.

Die Immunfluoreszenzfärbung für Akt wurde mit dem fluorfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper Alexa568 (orange) durchgeführt, die Färbung für pAkt Ser473 erfolgte mit Alexa488 (grün). Die Blockade von Erk bewirkte bereits bei der Lösungsmittelkontrolle (Ethanol) eine Zunahme der nukleären Aktlokalisierung. Bei zusätzlicher E2-Behandlung der Zellen erhöhte sich der Anteil an pAkt Ser473 im Zellkern.

P70S6K-Phosphorylierungen

Die Phosphorylierung von p70S6K an Thr389 als Indikator für die Kinaseaktivität war zum Teil Schwankungen unterworfen. Allerdings führte auch hier eine Blockierung der Erk-Aktivität bei E2-Stimulation zu einer Reduktion der Phosphorylierung besonders unter adaptiven hypertrophen Bedingungen (Abb. 28).

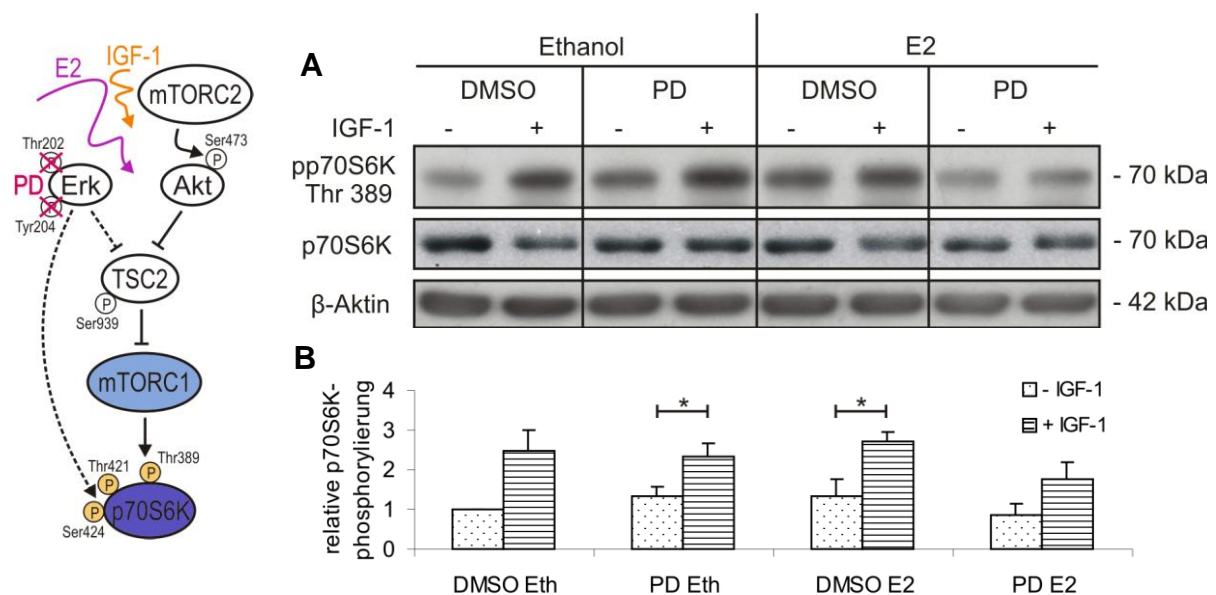


Abb. 28: Reduktion der p70S6K-Aktivität durch Erk-Blockade bei E2-Stimulation unter physiologischen hypertrophen Bedingungen.

Unter der Behandlung mit IGF-1 war im Westernblot (A) ein Anstieg des Phosphorylierungsgrades von p70S6K an Thr 389 erkennbar, jedoch nicht bei Kostimulation der Zellen mit E2 und PD184352. Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 6 Versuchen zusammen. Sowohl bei den basal behandelten Zellen als auch in der IGF-1-Gruppe führte die Blockierung der Erk-Aktivität bei E2-Stimulation zu einer Reduktion des Phosphorylierungsgrades. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. * $p < 0.05$.

Neben der Phosphorylierung an Thr389 als Indikator für die Kinaseaktivität von p70S6K interessierte uns in Hinblick auf den Einfluss von Erk auf den Akt/mTor-Signalweg zusätzlich die Erk-spezifischere Phosphorylierung an Thr421/Ser424. Die Behandlung der Zellen mit IGF-1 führte zu einer verstärkten p70S6K-Phosphorylierung an Thr421/Ser424, die durch die Blockierung von pErk unter das Basalniveau (Ethanol, DMSO, - IGF-1) gesenkt wurde (Abb. 29).

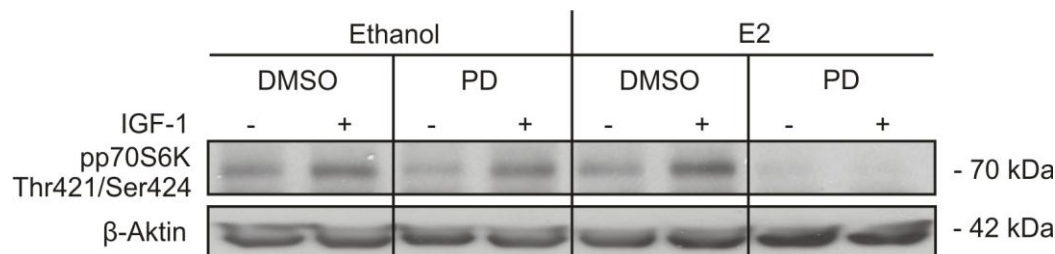


Abb. 29: Hemmung der IGF-1-induzierten Zunahme des Phosphorylierungsgrades von p70S6K an Thr421/Ser424 durch Blockade der Erk-Aktivität.

Die PD184352-Inkubation führte zu einer reduzierten p70S6K-Phosphorylierung an den Erk-spezifischen Stellen Thr421/Ser424. Es fiel auf, dass die Hemmung bei gleichzeitiger E2-Inkubation gegenüber der Lösungsmittelkontrolle stärker ausgeprägt war.

Zusammenfassend zeigen die Versuche mit dem MAPKK1/2-Inhibitor PD184352 und dem ER-Blocker ICI182,780, dass E2 in der Langzeitstimulation einen regulierenden Effekt auf die Kinasen des Akt/mTor-Signalweges ausübt, der Erk-abhängig ist: Unter adaptiv-hypertrophen Kulturbedingungen resultiert eine Blockade der Erk-Aktivität zwar in einer Phosphorylierungszunahme der mTORC2-downstream Kinase Akt, aber andererseits auch in einer Reduktion der Phosphorylierung von p70S6K an Thr389 als Parameter für die mTORC1-Aktivierung. Die Gesamtproteinexpression der Kinasen wurde durch die E2-Inkubation der Zellen nicht beeinflusst.

Darüber hinaus führt E2 vermittelt durch die ER zu einer Zunahme nukleär-lokalisierter Akts.

4.2.2. Modulation des Akt/mTOR–Signalweges durch E2 bei adaptiver Langzeitstimulation mit IGF–1 und Auswirkungen auf die Zellgröße

Die ersten Versuche der Langzeitstimulation nutzten wir um zu untersuchen, ob die von uns gewählte Modellsubstanz der adaptiven Hypertrophie, IGF–1, in den HL–1–Zellen tatsächlich die Entwicklung einer Hypertrophie induzieren würde. Dabei interessierte uns besonders ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von DMSO als Lösungsmittel des ER–Blockers ICI182,780 und des Erk–Blockers PD184352. Wir führten Versuche mit DMSO–Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-3} durch. Es zeigten sich deutliche konzentrationsabhängige Größenänderungen der Zellen (Abb. 30). IGF–1 führte bei allen eingesetzten Konzentrationen unter E2–Kulturbedingungen zu einer Zunahme der Zellgröße. Die deutlichste Größenzunahme gegenüber der Ethanolkontrolle wurde bei einer DMSO–Konzentration von 10^{-5} erreicht.

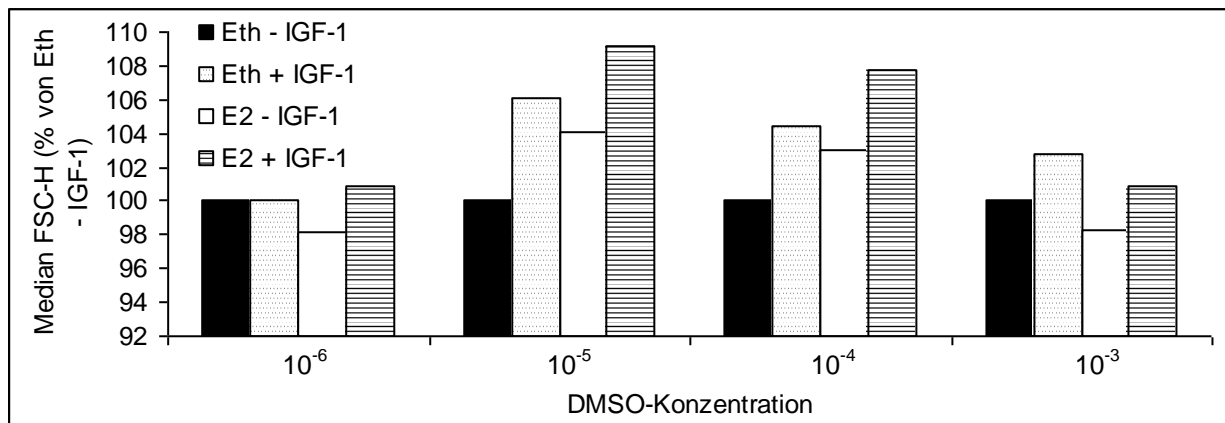


Abb. 30: DMSO–konzentrationsabhängige Größenzunahme der Zellen unter IGF–1–Stimulation.

Die Zellgröße der Ethanol–behandelten Zellen ohne IGF–1–Stimulation entspricht jeweils 100%, die eingesetzte DMSO–Konzentration nimmt von links nach rechts pro dargestellter Säulengruppe um das 10–fache zu. Die Werte von 10^{-6} und 10^{-4} DMSO repräsentieren einen Versuch, bei den Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-3} wurden die Ergebnisse von 5 Versuche zusammengefasst und als Mittelwerte angegeben.

Unter Langzeitkulturbedingungen mit dem ER–Blocker ICI182,780 zeigten sich zum Teil große Schwankungen der Ergebnisse, sodass leider aufgrund der Variabilität keine definitive Aussage zur Rolle der ER bei der modulierenden Wirkung von E2 auf die Zellgröße getroffen werden konnte.

4.2.3. Rolle der Erk-Aktivierung bei der Vermittlung adaptiv-hypertropher Effekte

Die Beteiligung von Erk an der Entwicklung einer adaptiven aber auch maladaptiven Hypertrophie von Kardiomyozyten wird kontrovers diskutiert.

Bei den Versuchen mit PD184352 setzten wir neben der für die Westernblots verwendeten Konzentration von 1 μM (DMSO 10^{-4}) zunächst auch 100 nM (DMSO 10^{-5}) ein. Beim Vergleich der Ergebnisse waren nur geringfügige Abweichungen bezüglich der Größenänderungen der Zellen erkennbar, sodass wir uns bei den weiteren Versuchen für die niedrigere DMSO- bzw. PD-Konzentration entschieden.

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den IGF-1-stimulierten Zellen führte eine E2-Vorbehandlung zur Zunahme der Zellgröße. Eine PD-Präinkubation führte stets zu einer Reduktion der Zellgröße. Diese war unter E2-Kulturbedingungen besonders stark ausgeprägt (Abb. 31).

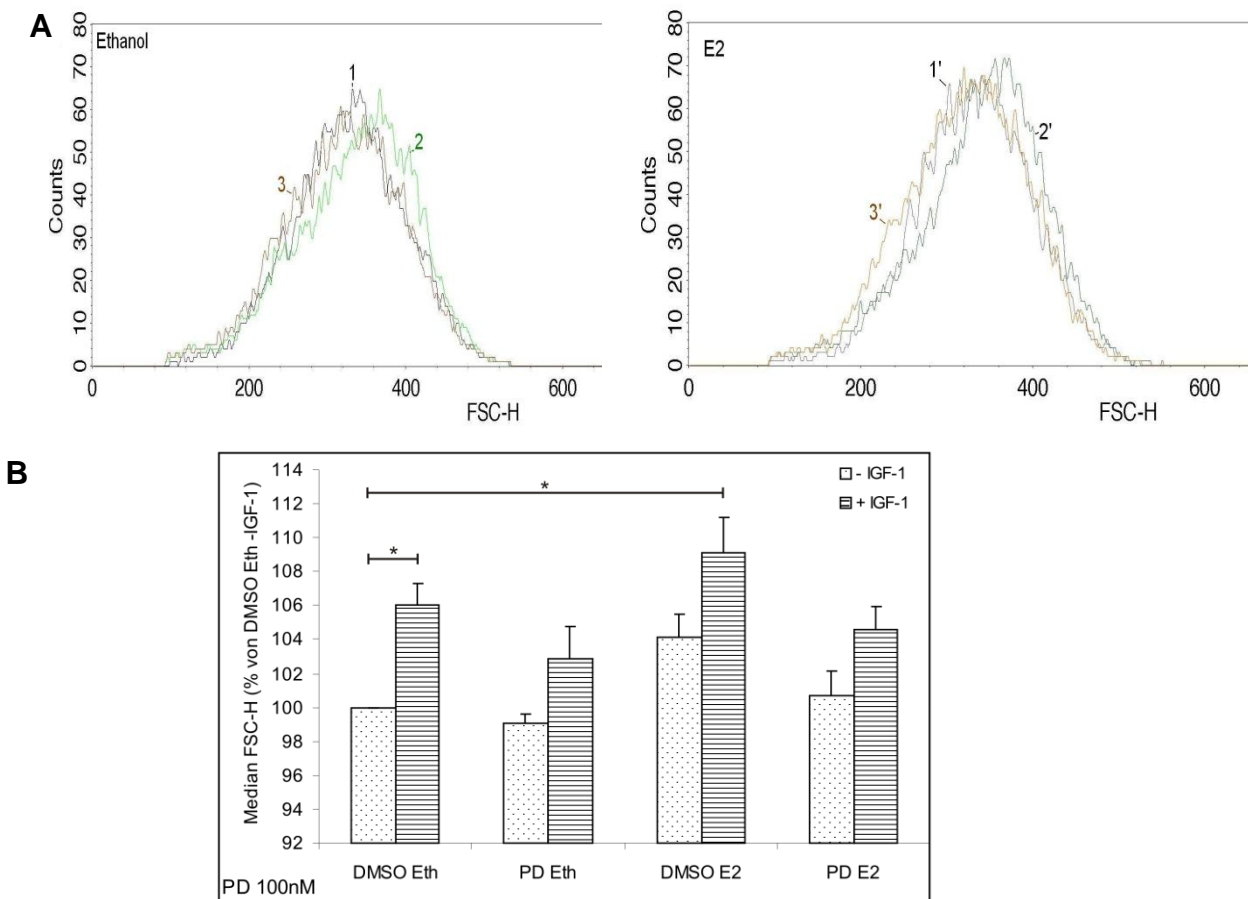


Abb. 31: E2- und IGF-1-bedingte Zunahme der Zellgröße ist durch Blockade der Erk-Aktivität mittels PD184352 reduzierbar.

Die oberen beiden Abbildungen (A) zeigen exemplarisch das Ergebnis einer FACS-Analyse: Links sind die Lösungsmittel behandelten Zellen zu sehen (1 [Ethanol DMSO – IGF-1]; 2 [Ethanol DMSO + IGF-1]; 3 [Ethanol PD184352 + IGF-1]), rechts die Zellen unter E2-

Kulturbedingungen (1' [E2 DMSO – IGF–1]; 2' [E2 DMSO + IGF–1]; 3' [E2 PD184352 + IGF–1]). Das Diagramm (B) fasst die Ergebnisse von 4 Versuchen zusammen. Es zeigte sich, dass die E2–Inkubation zu einer Zunahme der Zellgröße führte. Eine IGF–1 Stimulation resultierte in einer zusätzlichen Größenzunahme der Zellen. Die Effekte konnten durch eine Erk–Blockade mittels PD184352 deutlich reduziert werden. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. * $p < 0.05$.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Erk–Signalweg an der E2–vermittelten Zunahme der Zellgröße unter adaptiven Bedingungen beteiligt ist, da eine Erk–Blockade zu einer Reduktion der Zellgröße führt, die annähernd dem Lösungsmittelniveau entspricht.

5. Diskussion

Die "gender-oriented medicine", also die Idee eines geschlechtsspezifischen Ansatzes der Ätiologie, Pathogenese und Therapie von Krankheiten, ist ein junges, interdisziplinäres Teilgebiet der Humanmedizin. Neben zahlreichen klinischen Studien erbrachte die Grundlagenforschung der letzten beiden Jahrzehnte Kenntnisse über eine Vielzahl an Unterschieden in verschiedensten Organsystemen zwischen Männern und Frauen. Von besonderem Interesse ist dabei unter anderem das kardiovaskuläre System, für das sich beispielsweise ein gewisser protektiver Effekt von Frauen gegenüber Männern bezüglich des Herzinfarkt- oder Schlaganfallrisikos gezeigt hat. Es konnte allerdings auch eine deutliche Zunahme der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei post- versus prämenopausalen Frauen beobachtet werden, sodass der weibliche E₂-Hormonstatus eine nicht unerhebliche Rolle in der Genese von Erkrankung des Herzkreislaufsystems zu spielen scheint ¹³.

5.1. Zellkulturmodell und verwendete Medien und Lösungsmittel

In diesem Bereich setzt die vorliegende Arbeit an. Es wurden in vitro Versuche mit HL-1-Zellen durchgeführt, einer gut etablierten Modellzelllinie für Untersuchungen adulter Kardiomyozyten ¹¹⁷. Es handelt sich dabei um immortalisierte weibliche murine Vorhofkardiomyozyten, die vom Phänotyp adulten weiblichen murinen Kardiomyozyten ähneln (Vorhandensein von hochgeordneten Myofibrillen und Glanzstreifen, Fähigkeit zu spontanen Kontraktionen, Expression von α -MHC, α -kardialem Aktin, Desmin und Connexin43, Vorhandensein herzspezifischer spannungsabhängiger Ionenkanäle) ¹¹⁴. Allerdings ist davon auszugehen, dass die erhaltene Teilungsfähigkeit der Zellen zu einer geringer differenzierten und weniger organisierten Ultrastruktur führt, vergleichbar mit der von mitotisch-aktiven embryonalen Myozyten ¹¹⁴. Claycomb et al. als Entwickler der HL-1 Zelllinie beschreiben diese eher repräsentativ für eine Kreuzung aus embryonalen und adulten Kardiomyozyten als eine intermediäre Stufe der Herzmuskelzellentwicklung. Es liegt auf der Hand, dass primär adulte Kardiomyozyten das beste Modell für die von uns durchgeführten in vitro Untersuchungen dargestellt hätten. Allerdings besitzen diese Zellen Eigenschaften, durch welche sie für unsere Experimente ungeeignet waren: Zum einen sei an dieser Stelle erwähnt, dass aus einem Mausherz nur eine relative geringe Anzahl an Kardiomyozyten isoliert werden

kann (nach Erfahrungswerten unserer Laborgruppe ca. 1.5 bis 5×10^5 , für einen durchschnittlichen Versuch benötigten wir ca. 10^7 Kardiomyozyten). Dazu kommt die geringe Lebensdauer primär isolierter adulter Kardiomyozyten von wenigen Tagen. Dadurch ist eine längere Kultivierung und Stimulation dieser Zellen, beispielsweise über den von uns untersuchten Zeitraum von 3×24 Stunden, nicht möglich. Neonatale, also noch teilungsfähige, Zellen sind dagegen bezüglich der oben erwähnten phänotypischen Merkmale noch weiter vom adulten Kardiomyozyten entfernt als die von uns verwendeten Zellen. Diese stellen also einen experimentellen Kompromiss dar, wobei eine gute Korrelation der Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Experimenten bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert werden konnte ¹¹⁸.

In unseren Versuchen simulierten wir einen prämenopausalen (E2-Zellkulturbedingungen) und einen postmenopausalen Zustand (Lösungsmittelkontrolle) der weiblichen Kardiomyozyten und untersuchten den Einfluss des E2-Hormonstatus auf den Akt/mTor- und Erk-Signalweg, die bekanntermaßen Signalkaskaden der Herzmuskelhypertrophie darstellen. Darüber hinaus wurden adaptive hypertrophe Bedingungen, wie sie zum Beispiel im Rahmen körperlicher Aktivität oder einer Schwangerschaft auftreten, mittels IGF-1 nachgeahmt und die Beeinflussung der Größe der Kardiomyozyten durch die unterschiedlichen Zellkulturbedingungen untersucht.

Nach der Aussaat wurden die Zellen zunächst mit Claycomb-Medium inkubiert, das wie zahlreiche andere Nährmedien Phenolrot als pH-Indikator enthält. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Farbstoff auf Grund von strukturellen Ähnlichkeiten mit nicht-steroidalen Östrogenen (z.B. Sojaisoflavone) eine hormonelle Aktivität aufweist ¹¹⁹. Daher verwendeten wir als Zellkulturmedium ab 24 h vor Versuchsbeginn phenolrotfreies Medium 199. Dieses Nährmedium enthält allerdings ATP in einer Konzentration (ca. $1.8 \mu\text{M}$), für die bereits eine Erhöhung der Erk-Aktivität gezeigt werden konnte ¹²⁰. Dadurch lässt sich möglicher Weise die teilweise beobachtete ausgeprägte basale Erk-Phosphorylierung erklären. Auch eine ATP-bedingte Aktivierung von Akt wurde beschrieben: Unter anderem im Bereich der PH-Domäne führt eine Bindung von ATP zu einer Stabilisierung der Konformation, in welcher die für die Kinaseaktivität wichtigen Phosphorylierungsstellen Thr308 und Ser473 vor Dephosphorylierung geschützt sind ¹²¹. Allerdings wurden dabei ATP Konzentrationen bis zu 1mM eingesetzt, sodass die Effekte von ATP in der vorliegenden Arbeit nicht relevant sein dürften. Für mTor wurden ebenfalls direkte Interaktionen mit ATP

beschrieben, die zur Steigerung der enzymatischen Aktivität führen. Andererseits resultiert ein zu niedriges ATP-Level einhergehend mit einer erhöhten intrazellulären AMP-Konzentration über eine gesteigerte Tätigkeit der AMP-aktivierten Proteinkinase in einer reduzierten mTor-Aktivität mit nachfolgender Verringerung der p70S6K-Phosphorylierung¹²². Darüber hinaus sind auch Aminosäuren, insbesondere verzweigt-kettige wie Leucin, wesentlich an der Aktivierung von mTor beteiligt¹²³. Das von uns verwendete Medium199 enthielt essentielle Aminosäuren, allerdings in Konzentrationen, die die mTor-Aktivität nicht wesentlich beeinflusst haben dürften (Bsp. L-Leucin ca. 0.45 mM).

In den Langzeitversuchen wurde das Medium199 zunächst mit 2.5% FKS supplementiert. Auf Grund der FKS-induzierten Aktivierung von Erk und p70S6K in Kardiomyozyten erfolgte die Inkubation der Zellen ab 24 h vor Stimulation hingegen in FKS-freiem Medium199¹²⁴. In den Langzeitversuchen mit PD184352 (Hemmung der Erk-Aktivität) wurde DMSO als Lösungsmittel eingesetzt. Auch für diese Substanz wurden Interaktionen mit dem mTor-Signalweg beschrieben, wobei die von uns verwendeten Konzentrationen (max. 0.1%) niedriger waren als jene, bei denen Effekte beschrieben wurden¹²⁵.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl der Akt/mTor- als auch der Erk-Signalweg zentrale Komponenten der Umwandlung von Wachstumssignalen in gesteigerte Proteinsynthese, Zellgröße sowie Zellüberleben darstellen und daher eine erhöhte Beeinflussbarkeit bezüglich Zellkulturmedien und Lösungsmitteln aufweisen.

Wir minimierten diese Einflussfaktoren, indem die Versuche mit serum- und phenolrotfreiem Stimulationsmedium durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurden mögliche Lösungsmittelleffekte in allen Experimenten untersucht und bei der Interpretation der Stimulationsergebnisse berücksichtigt.

Nachfolgend sollen die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit diskutiert werden: Zunächst werden die Resultate der Kurzzeitversuche besprochen. In unseren Experimenten hatte sich gezeigt, dass E2 ER-vermittelt bereits nach wenigen Minuten Einfluss auf die Erk-Phosphorylierung ausübte, während sich eine erhöhte Akt-Phosphorylierung erst nach 1.5 Stunden zeigte. Für die gemeinsame downstream-Kinase p70S6K konnte zu beiden Zeitpunkten eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades beobachtet werden. In der Langzeitstimulation zeigte sich, dass E2 unter adaptiven hypertrophen Bedingungen abhängig von pErk einen koaktivierenden Einfluss auf den Akt/mTor-Signalweg ausübt, welcher mit einer Zunahme der Größe unserer HL-1-Zellen verbunden war. ER-

abhängig bewirkte das weibliche Geschlechtshormon eine Zunahme von nukleär lokalisiertem Akt, dem kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden.

5.2. Aktivierung der Erk- und Akt/mTor-Signalwege bei Kurzzeitstimulation mit E2

Die Steigerung der intrazellulären Proteinsynthese ist eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung der Herzmuskelhypertrophie. Ein an der Proteintranslation beteiligtes Enzym stellt die p70S6-Kinase dar. Dabei handelt es sich um ein downstream target sowohl des Akt/mTor- als auch des Erk-Signalweges. Bezüglich einer ausführlichen Beschreibung der beiden Signalkaskaden möchte ich auf die Einleitung dieser Arbeit verweisen. Um unnötige Wiederholungen zu vermeiden sollen an dieser Stelle die beiden Kaskaden nur noch einmal umrissen werden, da eine grobe Kenntnis der Zusammenhänge der einzelnen Kinasen für das Verständnis der nachfolgend geschilderten Ergebnisse unerlässlich ist. Der Akt/mTor-Signalweg wird typischerweise über einen Tyrosinkinase-rezeptor beispielsweise durch IGF-1 aktiviert⁴⁴. Zentrale und damit auch namensgebende Kinase der Kaskade ist der mTor-Komplex, für dessen regulatorische Funktion die Assoziation mit zwei verschiedenen Proteinen von Bedeutung ist: In Kombination mit Rictor spricht man von mTORC2, einer Kinase, die beispielsweise von entscheidender Bedeutung für die Akt-Phosphorylierung an Ser473 ist⁵³. Phosphoryliertes Akt wiederum ist in der Lage weitere downstream Kinasen zu aktivieren, unter anderem auch den mTor-Komplex, wenn er mit Raptor assoziiert vorliegt (mTORC1)⁶⁵. mTORC1 reduziert unter anderem die Autophagie von Zellen und ist außerdem an der Regulation der RNA-Translation beteiligt, indem es wiederum entsprechende Kinasen aktiviert⁷³⁻⁷⁴. Eine davon ist p70S6K, deren Phosphorylierungsgrad somit als Surrogat-Parameter für die mTORC1-Aktivität genutzt werden kann. Allerdings liegt auf der Hand, dass auch andere Kinasen an der Aktivierung von p70S6K beteiligt sind. So existieren unter anderem die Erk-spezifische Phosphorylierungsstellen Thr421/Ser424. Erk, auch p42/44MAPK1/2 genannt, ist als ein downstream target des dreistufigen MAPK-Signalweges wesentlich an der intrazellulären Verarbeitung extrazellulärer Signale beteiligt³¹. Diese Signalkaskade ist gekennzeichnet durch eine komplexe Interaktion mit anderen Signaltransduktionswegen (wie zum Beispiel dem Akt/mTor-Signalweg) und ist unter anderem durch die

Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder anderen Enzymen an der Regulation von zellulärem Wachstum und Differenzierung beteiligt³⁶.

Die Durchführung von Kurzzeitversuchen über einen Zeitraum von maximal 120 min diente der Untersuchung nicht-genomischer Effekte von E2. Bekanntermaßen ist die physiologische E2-Sekretion beim Menschen Bestandteil eines homeostatischen Regelkreises, in welchem die pulsatile Freisetzung von Gonadotropin-Releasing Hormon eine zentrale Rolle spielt¹²⁶. Während die GnRH-Ausschüttung bei Männern relativ konstant alle 90 bis 110 min erfolgt, scheint der Prozess bei prämenopausalen Frauen während eines Ovulationszykluses komplexer abzulaufen¹²⁷. Dennoch ist von einem ebenfalls oszillierenden Verlauf der E2-Sekretion auszugehen, sodass die Kurzzeitstimulation der Zellen die physiologische Situation im Sinne von rezidivierenden kurzen E2-Impulsen möglicherweise besser abbildet als die in unseren Langzeitversuchen durchgeführte kontinuierliche E2-Inkubation für 3 mal 24 Stunden. Der von uns experimentell ermittelte Einsatz von 10 nM E2 stellt eine in zahlreichen Arbeitsgruppen etablierte Konzentration bei in vitro Versuchen mit isolierten, kultivierten Myozyten dar^{97, 128}.

Die früheste Aktivierung einer Kinase durch E2 in den beiden untersuchten Signalkaskaden beobachteten wir für p44/42 MAPK, auch als Early response kinase, also Erk bezeichnet. Bereits nach 10 min erreichte die Erk-Phosphorylierung an Thr202 und Tyr204 ihr Maximum. Auch für die Lösungsmittelkontrollen zeigte sich eine frühe Aktivierung von Erk, die allerdings moderater ausgeprägt war als bei E2-Stimulation. Erklärbar ist diese unspezifische, für diese Signalkaskade typische frühe Phosphorylierung möglicherweise durch mechanische Irritationen der Zellen, die sich trotz aller Sorgfalt im Rahmen der Stimulationsbeendigung sowie Zelllyse nicht vermeiden ließen. In Osteoblasten wurde eine Steigerung der Erk-Phosphorylierung auf über 400% durch den Einfluss temporärer Scherkräfte beschrieben¹²⁹. Des Weiteren ist die MAPK-Kaskade bekanntermaßen an der Mechanotransduktion, also der Transformation eines mechanischen Stimulus in eine zelluläre Antwort, in Kardiomyozyten beteiligt, beispielsweise resultierte die pulsatile Dehnung von kultivierten Kardiomyozyten über eine auto- bzw. parakrine Sekretionssteigerung von VEGF in einer deutlichen Zunahme von pErk innerhalb der ersten 10 min¹³⁰⁻¹³¹.

Nicht-genomische Effekte von E2 auf die Erk-Phosphorylierung sind unter anderem in MCF-7-Brustkrebszellen untersucht worden: Auch hier zeigte sich eine frühe Aktivierung nach 15 min, für die eine Assoziation des ER α mit der Zellmembran

notwendig war ¹³². Ein durch Hypoxie induzierter Anstieg der Erk-Phosphorylierung nach 15 min konnte in Kardiomyozyten, nämlich HL-1-Zellen, also der auch von uns verwendeten Zelllinie, beobachtet werden und wurde mit einer Zunahme der Expression des GPR30 in Verbindung gebracht ¹³³. Dieser membranständige Rezeptor vermittelt schnelle E2-Effekte unter anderem durch Aktivierung der Erk-Signalkaskade und könnte daher an der Vermittlung einer adaptiven Antwort von E2 auf eine Zellhypoxie zum Beispiel durch Reduktion der Apoptoserate von Bedeutung sein. Auch eine E2-Behandlung von neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten resultierte in der bekannten frühen Erk-Aktivierung zwischen 5 bis 15 min ¹³⁴. Hier untersuchte man zusätzlich den Einfluss von MAPK-Phosphatasen, zum Beispiel MKP1, mit dem Ergebnis, dass E2 die MAPK nicht nur auf der Ebene der gesteigerten Phosphorylierung transient aktiviert sondern auch die Deaktivierung der Kinasen reguliert.

Für pAkt Ser473 konnte dagegen eine E2-bedingte Zunahme des Phosphorylierungsgrades zu den späten Zeitpunkten, besonders nach 90 bis 120 min von uns beobachtet werden. Die Zunahme der Kinaseaktivität von Akt ziegte sich in einem ebenfalls erhöhten Phosphorylierungslevel der downstream Kinasen TSC2 und p70S6K zu diesen Zeitpunkten. In Kardiomyozyten ist eine E2-induzierte verstärkte Akt-Phosphorylierung mit nachfolgender Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege unter anderem nach Myokardinfarkt oder im Rahmen einer Herzinsuffizienz beschrieben ¹³⁵⁻¹³⁶. In einem Zellkulturmodell mit Kardiomyozyten wurde eine Akt-Aktivierung bereits nach 5 min E2-Inkubation beobachtet, welche auch nach 60 min und 5 Stunden Stimulation anhielt ¹¹⁰. In unseren Versuchen zeigte sich zwar ebenfalls eine frühe Akt-Phosphorylierung durch E2, allerdings kam es auch bei den Lösungsmittelkontrollen zu einer unspezifischen Zunahme. Diese war im Zeitverlauf jedoch rückläufig, während die E2-Stimulation auch nach 30, 90 und 120 min noch erhöhte Werte zeigte.

Gemeinsame downstream targets sowohl der Erk- als auch der Akt-Kinase stellen TSC2 und p70S6K dar. Dabei führt die Phosphorylierung von TSC2 zu dessen Inaktivierung, während die p70S6K-Phosphorylierung eine Aktivierung der Kinase zur Folge hat. Erk-spezifische Phosphorylierungsstellen sind Ser664 für TSC2 und Thr421/Ser424 für p70S6K ¹³⁷. Als Akt-spezifisch gelten dagegen die Stellen Ser939/Thr1462 für TSC2, während die p70S6K-Phosphorylierung indirekt über mTORC1 erfolgt ¹³⁸. Interessanterweise zeigte sich eine E2-induzierte erste Zunahme

der Phosphorylierung von TSC2 an Ser939 und p70S6K an Thr389, als Maß für die Gesamt-Aktivität der Kinase, ebenfalls bereits nach 15 min, ohne dass zu diesem Zeitpunkt eine verstärkte Akt-Aktivierung beobachtet werden konnte. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist also in unseren HL-1-Zellen von einer frühen E2-induzierten mTORC1-Aktivierung, gemessen an der p70S6K-Phosphorylierung, auszugehen, die Erk- und TSC2-vermittelt aber unabhängig von Akt zu verlaufen scheint. Für humane embryonale Nierenzellen (HEK293E) wurde bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung von TSC2 an Ser939 auch Erk-vermittelt erfolgen kann und dass die damit verbundene Reduktion des hemmenden Effekts der Kinase auf mTORC1 ausreicht, um die p70S6K-Aktivität zu erhöhen¹³⁸. Ein zweigipfliger Verlauf der p70S6K-Aktivität nach 30 und 120 min ergab sich für eine Leukämiezelllinie nach EPO-Stimulation¹³⁹. In vivo konnte gezeigt werden, dass die mTORC1-Aktivierung im Rahmen der durch mechanische Überbelastung erzeugten Hypertrophie von Skelettmuskelzellen zunächst Erk- und erst später Akt-vermittelt abläuft¹³⁷. Und auch in unseren Versuchen zeigte sich im weiteren Zeitverlauf eine Akt-transduzierte mTORC1-Aktivierung durch E2 mit einem Phosphorylierungsmaximum der p70S6K nach 90 min. Eine Akt- und TSC2-vermittelte Zunahme der p70S6K-Phosphorylierung durch E2 konnte auch in einem in vitro Kurzzeitversuch mit MCF-7 Zellen beobachtet werden¹⁴⁰. Die zum Teil deutlichen Schwankungen der p70S6K-Phosphorylierung in der Lösungsmittelgruppe sind ähnlich wie bei Erk möglicherweise Bewegungsartefakte: In Dehnungsversuchen mit Myoblasten zeigte sich eine Induktion der p70S6K-Phosphorylierung als direktes Ergebnis der Mechanotransduktion, unabhängig von den bekannten Signaltransduktionswegen¹⁴¹.

Neben den bereits erwähnten Akt-downstream targets TSC2 und p70S6K untersuchten wir in den Kurzzeitversuchen auch das Phosphorylierungsniveau von GSK3 α/β . Die Kinase reguliert unter anderem den kardialen Nährstoffmetabolismus, indem sie sowohl die Glykogensynthese als auch die Glykolyse beeinflusst¹⁴². Für beide Isoformen zeigte sich in unseren Versuchen eine E2-induzierte verstärkte Phosphorylierung bereits nach 15 min, die bis 120 min anhielt, sodass die verstärkte Aktivität von Akt, aber initial auch Erk als ursächlich betrachtet werden kann. Darüber hinaus ist eine PI3K-vermittelte, aber Akt-unabhängige GSK3 β -Phosphorylierung durch E2 beschrieben¹⁴³. Neben kardioprotektiven Effekten von GSK3 im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung kommt der Kinase auch Bedeutung bei der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie zu¹⁴⁴. GSK3 zählt dabei zu den Kinasen, die in ihrer unphosphorylierten

Form aktiv sind, dabei unter anderem zu einem veränderten Genexpressionsmuster von β -Catenin, NFAT oder GATA4 führen und dadurch hypertrophes Wachstum hemmen¹⁴⁴. Die Phosphorylierungsstellen Ser21 der α - bzw. Ser9 der β -Isoform, welche die GSK3-Kinaseaktivität entscheidend regulieren, stellen dabei bekannte Zielstellen der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung dar¹⁴⁵. Eine GSK3-Phosphorylierung durch Erk ist ebenfalls beschrieben¹⁴⁶. Der antihypertrophe Effekt der aktiven GSK3 wird vorwiegend der β -Isoform zugeschrieben⁶¹. Die Rolle von GSK3 α bezüglich der kardialen Hypertrophie war dagegen lange unklar. Mit Hilfe eines transgenen Mausmodells konnte schließlich gezeigt werden, dass die α -Isoform im Rahmen eines induzierten Hochdrucks die kardiale Hypertrophie reduzierte, allerdings zu verstärkter Apoptose und Fibrose einhergehend mit kardialer Dysfunktion führte¹⁴⁷. Die von dieser Arbeitsgruppe im Zusammenhang mit der verstärkten GSK3 α -Aktivität beschriebene Inhibierung von Erk konnte in unseren Kurzzeitversuchen nicht nachgewiesen werden, da wir sowohl eine hohe GSK3- als auch Erk-Aktivität in den ersten 15 min der E2-Stimulation beobachteten. Ein Versuch mit dominant negativen GSK3 β -Mäusen zeigte, dass eine anhaltende Hemmung der GSK3 β -Aktivität eine kompensatorische Hypertrophie induzierte, dabei Apoptose und Fibrose reduzierte und die kardiale Kontraktilität erhöhte¹⁴⁸. Zusammenfassend scheint sich eine Hemmung der GSK-Aktivität durch verstärkte Phosphorylierung der Kinase also zwar pro-hypertroph aber auch positiv auf das Überleben der Kardiomyozyten auszuwirken¹⁴⁴.

5.3. Rolle der ER bei der E2-induzierten Aktivierung der Erk- und Akt/mTor-Signalwege

Das Vorhandensein funktioneller ER konnte bereits 1997 in vitro für Rattenkardiomyozyten gezeigt werden und zahlreiche Versuche mit selektiv ausgeschalteten ER α oder ER β weisen auch bei Mäusen das Vorliegen der beiden klassischen ER nach^{96, 118, 149}.

Um zu untersuchen, ob die nicht-genomischen Effekte von E2 auf die Signalkaskaden abhängig von ER sind, verwendeten wir ICI182,780, einen kompetitiven Antagonisten sowohl des ER α als auch des ER β . Die von uns experimentell ermittelte und in den weiteren Versuchen eingesetzte, gegenüber der E2-Konzentration deutlich höhere ICI-Konzentration von 10 μ M liegt im Bereich der auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten Konzentrationen^{113, 150}. Eine Erklärung der notwendigen hohen

Konzentration bieten die Ergebnisse bezüglich der Wirkung oral verabreichter reiner E2–Antagonisten auf das Uterusgewicht bei Mäusen: Für ICI182,780 zeigte sich gegenüber E2 zwar eine höhere ER–Bindungsaffinität, die Inhibition der E2–Effekte lag allerdings konzentrationsabhängig lediglich zwischen 11 und 54% ¹⁵¹. Als ursächlich wird dabei die metabolische bzw. pharmakokinetische Konversion des Antiöstrogens betrachtet, bei unseren in vitro Versuchen könnte die Stabilität der Substanz den limitierenden Faktor darstellen.

Man geht davon aus, dass die Rezeptoren in Abwesenheit von E2 in einer hypophosphorylierten, inaktiven Form, assoziiert mit dem Hitzeschockprotein 90 vorliegen ¹⁵². In unseren Versuchen resultierte allerdings bereits eine basale Blockade der ER mittels ICI182,780 ohne zusätzliche E2–Stimulation teilweise in einer Reduktion der Erk– und auch Akt–Phosphorylierung, sodass von einer basalen Aktivierung der Kinasen durch die ER auszugehen ist. Für die downstream Kinase p70S6K waren dagegen keine Effekte nachweisbar.

Neben den klassischen genomischen Wirkungen von E2 konnten im Myokard auch schnelle, nicht–genomische Effekte beobachtet werden, wie beispielsweise die Modulation des L–Typ Calciumeinstroms in Kardiomyozyten ¹³⁴. Die genauen Mechanismen der nicht–genomischen E2–Effekte auf das Myokard, insbesondere in Hinblick auf die Hypertrophie, sind allerdings noch nicht genau verstanden. Da die ERs über keine eigene Kinaseaktivität verfügen, ist eine Transmission der Information vom E2–bindenden ER zu den intrazellulären Signalmolekülen durch andere Moleküle notwendig ¹⁵³. Eine zentrale Bedeutung scheint dabei die intrazelluläre Tyrosinkinase c–Src zu spielen, die direkt mit Tyrosinkinaserzeptoren, zum Beispiel dem IGF–1–Rezeptor, assoziiert ist ¹⁵³. Über Adaptor– und Gerüstproteine interagiert der ER mit c–Src und führt so zur Aktivierung beispielsweise der MAPK– oder Akt/mTor–Signalkaskade ^{153–154}. Darüber hinaus ist eine direkte Assoziation der ERs mit der p85 Untereinheit der PI3K beschrieben, die zur Aktivierung des Akt/mTor–Signalweges führt ¹⁵⁵. Man geht auch von einer Interaktionsmöglichkeit der ER mit GPCRs aus ⁹³. In unseren HL–1 Zellen zeigte sich für alle untersuchten Kinasen, Erk, Akt, GSK3, TSC2 und p70S6K, mindestens vorübergehend eine Abhängigkeit der verstärkten Phosphorylierung durch E2 von den ER. Wie zu erwarten war, fiel der Effekt bei Erk besonders deutlich zu einem frühen Zeitpunkt, nach 10 bis 15, bzw. 30 min, aus. Ähnliche Beobachtungen sind auch für adulte Rattenkardiomyozyten beschrieben ¹³⁴. Die aktivierte Erk–Kinase scheint wiederum in der Lage zu sein, den ER α zu

phosphorylieren und damit eine E2-unabhängige Aktivierung des Steroidrezeptors zu bewirken, was eine mögliche Erklärung für ICI-Effekte bei den Lösungsmittelkontrollen bietet ¹⁵⁶. Auch die E2-bedingte Akt-Phosphorylierung zu den späten Zeitpunkten war unter ICI182,780 reversibel, sodass von einem ER-abhängigen Effekt auszugehen ist. Patten et al. konnten in der Untersuchung einer E2-Behandlung auf das Überleben von Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt sogar den ER α als entscheidenden Vermittler der E2-induzierten Aktivierung von Akt identifizieren ¹¹⁰. Auch die E2-bedingte ebenfalls zu den späten Zeitpunkten erhöhte mTORC1-Aktivität, indirekt gemessen am erhöhten Phosphorylierungsgrad der Akt-downstream Kinase p70S6K, war abhängig von den ERs. Neben einer Aktivierung der p70S6K durch E2 ist die Kinase interessanterweise selbst in der Lage, den ER α zu phosphorylieren und damit zu regulieren ¹⁵⁷.

5.4. Regulation von mTORC1 durch E2 unter Langzeitstimulation mit IGF-1

Als Modellsubstanz der adaptiven Hypertrophie verwendeten wir IGF-1 in der für in vitro Versuche mit Kardiomyozyten etablierten Konzentration von 10 nM ¹⁵⁸. Die Substanz zählt zu den Polypeptiden, die im normalen Myokard nachweisbar sind und vermittelt dort neben der Differenzierung der Kardiomyozyten auch die physiologische Form der Herzmuskelhypertrophie ¹⁵⁹. In unseren Zellen führte die IGF-1-Stimulation zu einer sehr starken Aktivierung von Akt, während die Erk-Phosphorylierung keine wesentliche Veränderung zeigte. Ähnliche Beobachtungen machten Koricanac et al. bei der Untersuchung der kardialen Na/K-ATPase, die zeigte, dass Insulin, das in pharmakologischen Konzentrationen ebenfalls in der Lage ist, den IGF-1-Rezeptor zu aktivieren, lediglich zu einer Aktivierung von Akt, nicht jedoch von Erk führte ¹⁶⁰⁻¹⁶¹. Und auch Markou et al. machten die Beobachtung, dass die IGF-1-Stimulation in kultivierten Rattenkardiomyozyten zu einer deutlichen Verstärkung der Akt-Phosphorylierung führte, während sich bei pErk kaum Veränderungen zeigten ¹⁶². Allerdings ist auch eine Erk-Aktivierung durch IGF-1 beschrieben ¹⁶³. Es ist beschrieben, dass die extrazelluläre Bindung von IGF-1 zur intrazellulären Autophosphorylierung des Tyrosinkinase-Rezeptors mit nachfolgender Aktivierung von Signalmolekülen führt: Während die Aktivierung von Akt durch IRS-1 erfolgt, ist dabei auch eine Shc-vermittelte Erk-Aktivierung möglich ¹⁶⁴⁻¹⁶⁵.

Den Einfluss der Erk-Kinase auf den Akt/mTor-Signalweg bei adaptiver hypertropher Stimulation unter E2-Kulturbedingungen untersuchten wir mit PD184352, einer Substanz, welche die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Erk1/2 durch Blockade der upstream-Kinase verhindert¹⁶⁶. Im Unterschied zu anderen MAPKK-Blockern wie beispielsweise PD98059 oder U0126 weist PD184352 eine Spezifität für MAPKK1/2 auf¹¹⁶. Etabliert ist die Substanz vor allem für Untersuchungen der Tumorphagenese bzw. -suppression, dabei liegt die von uns experimentell ermittelte und in den nachfolgenden Versuchen eingesetzte PD-Konzentration von 1 µM im Bereich der in vitro Versuche anderer Arbeitsgruppen^{116, 166-167}.

An dieser Stelle soll in Hinblick auf die 3 mal 24-stündige E2-Inkubation der Zellen betont werden, dass diese Langzeitbehandlung mit E2 zwar zu einer Veränderung des Phosphorylierungsgrades der untersuchten Kinasen führte, ihre Gesamtproteinexpression davon allerdings unberührt blieb, sodass die Aktivierung der Kinasen durch E2 nicht nur kurzzeitig aufzutreten scheint sondern man vielmehr von einem lang anhaltenden, nicht-genomischen Effekt sprechen kann, wenngleich die Unterschiede bezüglich der Lösungsmittelkontrolle gegenüber der Kurzzeitstimulation deutlich geringer ausfielen. Unseren Erwartungen entsprechend führte die Präinkubation der HL-1-Zellen mit PD184352 unabhängig von der Zellstimulation (E2, IGF-1) zu einer starken Reduktion von pErk bei unveränderter Gesamtproteinexpression. Die Blockade von pErk resultierte unter E2-Kulturbedingungen in einem Anstieg von pAkt, welcher unter gleichzeitigen adaptiv-hypertrophen Bedingungen (IGF-1) besonders stark ausfiel und mit einer ebenfalls verstärkten Anreicherung von Akt im Zellkern einherging. Trotz der damit verbundenen erhöhten Kinaseaktivität von Akt zeigte sich für das downstream target p70S6K nicht nur bei den Erk-spezifischen Phosphorylierungsstellen eine Reduktion sondern auch die Gesamtaktivität der Kinase war durch die Blockade von pErk bei E2-Stimulation reduziert. Auch wenn die E2-bedingte Zunahme der p70S6K-Phosphorylierung unter adaptiv-hypertrophen Bedingungen nur gering ausfiel, ist also davon auszugehen, dass E2 unter adaptiv-hypertrophen Bedingungen zu einer verstärkten mTORC1-Aktivierung (gemessen an der Phosphorylierung von p70S6K) führt und dass dieser Vorgang abhängig von der Erk-Aktivität verläuft. Denkbar ist dabei eine indirekte Verstärkung der IGF-1 induzierten Signaltransduktion durch E2 beispielsweise durch die Kolokalisation von Signalmolekülen, ein Effekt, der auch bei Insulin in Bezug auf die EGF-Wirkung beschrieben ist¹⁶⁸. Rommel et al. konnten zeigen, dass die Möglichkeit

der „Cross-Regulierung“ zwischen dem Akt/mTor- und Erk-Signalweg abhängig vom Differenzierungsgrad der Myozyten ist ¹⁶⁹. Die Zunahme von pAkt nach PD-Präinkubation lässt sich unter anderem mit dem Wegfall der Rückwärtshemmung (negative feedback loop) durch die mit Erk gemeinsamen downstream Kinasen erklären ¹⁷⁰.

Eine Aktivierung der p70S6K durch Erk im Zusammenhang mit hypertrophem kardialen Wachstum insbesondere unter dem Einfluss von Angiotensin II (maladaptiven hypertrophen Bedingungen entsprechend) ist beschrieben ^{80, 171}. In unseren Versuchen zeigte sich nun, dass unter E2-Kulturbedingungen die p70S6K-Aktivität bei adaptiver hypertropher Stimulation ebenfalls Erk-abhängig ist. Eine Beteiligung der ER an den Effekten von E2 lässt sich auf Grund einer Reduktion der p70S6K-Phosphorylierung nach ICI-Präinkubation zwar vermuten, unspezifische ICI-Effekte bereits bei den Lösemittelkontrollen machen eine sicher Aussage allerdings schwierig. Erklärungsansätze für diese Effekte bieten zum Beispiel agonistische Wirkungen von ICI128,780 am GPR30, teilweise als G Protein-gekoppelter ER bezeichnet, die zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen und beispielsweise in der Lage sind, unabhängig von E2 eine Vasodilatation der Koronararterien zu induzieren ¹⁷². Darüber hinaus konnten Etique et al. zeigen, dass Ethanol selbst, welches in unseren Versuchen als Lösungsmittel eingesetzt wurde, in der Lage ist, den ER α ligandenunabhängig zu aktivieren ¹⁷³. In den in vitro Versuchen mit MCF-Zellen wurde dabei allerdings eine Ethanolkonzentration eingesetzt, die dem Tausendfachen der von uns verwendeten entsprach.

5.5. Regulation von mTORC2 durch E2 unter Langzeitstimulation mit IGF-1

Es ist bekannt, dass IGF-1 zu einer Aktivierung von Akt führt, die mit der Lösung der Kinase von der Zellmembran verbunden ist und zu einer Translokation in den Zellkern führt ¹⁷⁴. Als Translokationssignal scheint dabei eine posttranslationale Modifikation von Akt zu fungieren: Nämlich die dynamische Anheftung eines N-Acetylglucosamin-Restes ¹⁷⁵. Eine Erklärung für die Notwendigkeit der Translokation ist möglicherweise darin zu sehen, dass biologisch relevante Zielproteine der aktiven Kinase im Zellkern zu finden sind: So zum Beispiel der proapoptische Transkriptionsfaktor forkhead ¹⁷⁶.

Auch bei unseren HL-1-Zellen zeigte sich eine nukleäre Anreicherung von Akt nach Langzeitstimulation mit IGF-1. Darüber hinaus führte aber auch die Behandlung der Zellen mit E2 ER-abhängig zu einer deutlichen Zunahme von Akt im Zellkern.

Die subzelluläre Lokalisation von aktiviertem Akt ist unter anderem von entscheidender Bedeutung in Hinblick auf die Funktion der Kinase bei Brustkrebs¹⁷⁷. Camper-Kirby et al. konnten in Myokardproben sowohl von Menschen als auch von Mäusen eine geschlechtsspezifische Anreicherung von pAkt Ser473 im Zellkern nachweisen und sahen darin einen Erklärungsansatz für protektive kardiovaskuläre Effekte¹⁷⁶. Interessanter Weise konnten Nagoshi et al. wiederum zeigen, dass sich eine dauerhafte Aktivierung von Akt nach Myokardinfarkt negativ auf das Myokard auswirkt, wobei die feedback inhibition der PI3K und deren Zielmoleküle als ursächlich gesehen wird¹⁷⁸.

5.6. Effekte von E2 auf die zelluläre Hypertrophie

Der adaptiven Herzmuskelhypertrophie, wie sie beispielsweise im Rahmen der Schwangerschaft auftritt, werden positive Effekte auf Grund einer Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie der direkten Beeinflussung zellulärer und molekularer Umbauprozesse des Herzens zugeschrieben¹¹⁵. Daher ist sie Gegenstand zahlreicher Studien, wobei das Laufradtraining bei Tieren und die IGF-1-Stimulation bei in vitro Versuchen etablierte Untersuchungsmethoden darstellen. Die durch IGF-1 initiierte hypertrophe intrazelluläre Signaltransduktion lässt sich sicher nicht auf eine einzelne Signalkaskade zurückführen. Vielmehr sollte man von einem komplexen Netzwerk ausgehen, in welchem den einzelnen Kaskaden ein unterschiedliches Maß an Bedeutung zukommt. Schnabel et al. stellten zum Beispiel die Phospholipase C als relativ zentrale Schnittstelle dieses Netzwerkes dar und zeigten, dass sowohl eine Blockade von Erk, als auch der PI3K oder p70S6K den Effekt aufhob¹⁷⁹. Ein anderes Verfahren zur Induktion kardialer Hypertrophie bei Tieren stellt das „transverse aortic banding“ (TAC) dar¹⁸⁰. Dabei zeigte sich, dass die Rolle von IGF-1 neben einem veränderten Hypertrophieverhalten auch in einer reduzierten Apoptoserate der Kardiomyozyten und damit verbunden weniger Fibrose und erhaltener Kontraktilität des Herzmuskels zu sehen ist¹⁸⁰.

In unseren HL-1-Zellen resultierte die Langzeitstimulation mit IGF-1 in einer Zunahme der Zellgröße. Auffällig war allerdings, dass die Größenzunahme abhängig von der Lösungsmittelkonzentration (DMSO) unterschiedlich stark ausfiel. Es ist nicht

auszuschließen, dass dieser Effekt von DMSO durch Veränderungen des Differenzierungsgrades der HL-1-Zellen hervorgerufen wird, wie er für vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen beschrieben wurde¹²⁵. Neben seiner Rolle als Lösungsmittel hat sich DMSO, deutlich höher konzentriert, auch als Chemikalie in der Kryokonservierung etabliert¹⁸¹. In diesen hohen Konzentrationen wirkt DMSO bei Raumtemperatur bekanntermaßen zytotoxisch: unter anderem werden die Adhäsions- sowie die Teilungsfähigkeit von Zellen negativ beeinflusst¹⁸¹. Die Toxizität ist dabei neben der DMSO-Konzentration auch von der Zelldichte abhängig¹⁸². Effekte von DMSO auf die Zellgröße scheinen dagegen in der Literatur noch nicht beschrieben zu sein. Darüber hinaus wurden die Untersuchungen bezüglich der Toxizität bei einer Verdünnung in der Größenordnung von 10^{-1} durchgeführt, die höchste von uns eingesetzte Konzentration entsprach einem Hundertstel dieses Wertes¹⁸¹.

Bei unseren HL-1-Zellen zeigte sich die größte Zunahme der Zellgröße bei Stimulation mit IGF-1 unter E2-Kulturbedingungen, was vereinbar mit adaptivem Größenwachstum ist. In der Literatur findet man dagegen überwiegend antihypertrophe Effekte von E2. Bei genauerer Betrachtung fällt dabei allerdings auf, dass fast ausschließlich die maladaptive Hypertrophie von Kardiomyozyten inhaltlicher Schwerpunkt der veröffentlichten Artikel zu sein scheint: Dabei wird in den Tierversuchen bevorzugt das bereits erwähnte TAC angewandt, bei dem durch erhöhte Druckbelastung des Herzmuskels eine Myokardhypertrophie induziert wird oder es wird ein aorto-cavaler Shunt operiert, der zu einer erhöhten Volumenbelastung führt^{113, 183}. Bei den in vitro Versuchen überwiegt der Einsatz der (maladaptiv) prohypertrophen Substanzen Angiotensin II oder ET-1⁹⁷. Ein gängiger Erklärungsansatz auf Signaltransduktionsebene für den antihypertrophen Effekt von E2 stellt dabei die Hemmung des Calcineurin-NFAT-Signalweges, der als ein zentraler Signalweg der maladaptiven Myokardhypertrophie gilt, dar^{97, 113}. Patten et al. konnten zeigen, dass der Effekt von E2 auf die Größe der Kardiomyozyten abhängig vom hypertrophen Stimulus ist: So führte E2 nach TAC bei Mäusen zu der bekannten Reduktion der Kardiomyozytenhypertrophie, während das Hormon nach Myokardinfarkt eine prohypertrophe Wirkung zeigte¹⁸⁴.

Eine Vorbehandlung unserer Zellen mit PD184352 resultierte in einer deutlichen Reduktion der E2- und IGF-1-induzierten Hypertrophie. Diese Beobachtung ist kongruent mit den Ergebnissen der untersuchten Signalkaskaden: E2 erhöhte Erk-

abhängig die mTORC1–Aktivität (gemessen an der p70S6K–Phosphorylierung), was mit einer Zunahme der Zellgröße einherging.

Haddad et al. machten ähnliche Beobachtungen an Skelettmuskelzellen von Ratten: Die Blockade von pErk reduzierte die durch IGF–1 induzierte p70S6K–Phosphorylierung sowie die Hypertrophie der Zellen (gemessen an der Proteinbiosynthese) ¹⁸⁵.

5.7. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

Anhand der vorliegenden Ergebnisse erscheint E2 als ein nicht–genomischer Coaktivator von mTORC1 des Akt/mTor–Signalweges. Während bei E2–Kurzzeitstimulation der „crosstalk“ zwischen den beiden untersuchten Signalkaskaden Erk und Akt/mTor nur in geringem Ausmaß vorhanden ist, zeigt sich bei der Langzeitstimulation mit IGF–1 deutlich eine Interaktion von E2 mit Erk bei der Vermittlung der adaptiv–trophischen Effekte auf Kardiomyozyten. Eine Abhängigkeit der E2–Effekte von der Kooperationsmöglichkeit mit IGF–1 konnte auch von Giunta et al. gezeigt werden. In dieser Studie wurden zwar neuroprotektive Effekte von E2 untersucht, aber ähnliche Wirkungsbeziehungen von E2 und IGF–1 am Myokard sind prinzipiell denkbar, soll heißen, dass höhere IGF–1–Spiegel bei prämenopausalen Frauen die kardioprotektive Wirkung von E2 verstärken könnten ¹⁸⁶. Die Effekte von E2 auf die Kinaseaktivitäten der beiden untersuchten Signalwege sind abhängig vom Vorhandensein der Östrogenrezeptoren, ohne dass diese einen Einfluss auf die Gesamtproteinexpression der Kinasen ausüben, was die Bedeutung von E2 unterstreicht, intrazelluläre Signalprozesse nicht–genomisch zu beeinflussen. Daneben darf aber nicht das Potential vergessen werden, das E2 auch als zellkerngängiges Steroidhormon bezüglich intrazellulärer Signalwege besitzt: So ist es in der Lage, den Anteil an nukleär–lokalisiertem und damit kardioprotektiv–wirkendem Akt zu erhöhen. Will man einen klinischen Bezug wagen ist es also zum Einen vorstellbar, dass (prämenopausale) Frauen eine gewisse Protektion gegenüber maladapтив–hypertrophen Veränderungen des Myokards aufweisen, weil ihre adaptiven Prozesse verstärkt ablaufen und dadurch ein effektives physiologisches Gegengewicht zu pathologischen Vorgängen besteht. Dazu passen auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Beispielsweise zeigten Buss et al., dass die chronische Hemmung von Akt bei Mäusen die Entwicklung einer maladapтив Myokardhypertrophie verstärkt,

während adaptiv–hypertrophe Prozesse aufgehoben wurden⁸⁶. Neben der eigentlichen hypertrophen Signaltransduktion sollten dabei auch die weiteren kardioprotektiven Effekte der Akt/mTor–Kaskade nicht aus dem Fokus geraten: Schutz vor Autophagie und Apoptose seien nur als die beiden offensichtlichsten genannt. Eine weitere klinische Bedeutung dieser Arbeit ergibt sich aus der Brustkrebstherapie von Frauen mit Antiöstrogenen bei hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom. Dabei ist die negative Beeinflussung adaptiver kardialer Remodelingprozesse eine ernstzunehmende Therapienebenwirkung, sodass die beginnende Arbeit mit spezifischen SERMs in der Grundlagenforschung für zukünftige Patientinnen einen echten Benefit bedeuten könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen. In: <https://www-genesis.destatis.de>: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2011.
2. Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1454-9.
3. Zoccali C. How important is echocardiography for risk stratification in follow-up of patients with chronic kidney disease? *Nat Clin Pract Nephrol* 2007;3:178-9.
4. Diwan A, Dorn GW, 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:56-64.
5. Arasteh K, Baenkler H-W, Bieber C, et al. Herzinsuffizienz. In: *Duale Reihe Innere Medizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009:1496.
6. Vatner SF. Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1988;62:94E-8E.
7. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
8. Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 2003;107:984-91.
9. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996;275:1557-62.
10. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:589-600.
11. Pavlik G, Major Z, Varga-Pinter B, Jeserich M, Kneffel Z. The athlete's heart Part I (Review). *Acta Physiol Hung* 2010;97:337-53.
12. Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Lehmkuhl HB, Hetzer R. Gender aspects in heart failure. Pathophysiology and medical therapy. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004;97:899-908.
13. Hayward CS, Kelly RP, Collins P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res* 2000;46:28-49.

14. Liao Y, Cooper RS, Mensah GA, McGee DL. Left ventricular hypertrophy has a greater impact on survival in women than in men. *Circulation* 1995;92:805-10.
15. de Simone G, Devereux RB, Kimball TR, et al. Interaction between body size and cardiac workload: influence on left ventricular mass during body growth and adulthood. *Hypertension* 1998;31:1077-82.
16. Luczak ED, Leinwand LA. Sex-based cardiac physiology. *Annu Rev Physiol* 2009;71:1-18.
17. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1068-79.
18. Molkentin JD. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res* 2000;87:731-8.
19. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998;93:215-28.
20. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-80.
21. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004;109:1580-9.
22. McMullen JR, Shioi T, Huang WY, et al. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 2004;279:4782-93.
23. Scheuer J, Malhotra A, Hirsch C, Capasso J, Schaible TF. Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *J Clin Invest* 1982;70:1300-5.
24. Molkentin JD, Dorn GW, 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 2001;63:391-426.
25. Rao TP, Kuhl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 2010;106:1798-806.
26. Barry SP, Townsend PA. What causes a broken heart--molecular insights into heart failure. *Int Rev Cell Mol Biol* 2010;284:113-79.
27. Kunisada K, Hirota H, Fujio Y, et al. Activation of JAK-STAT and MAP kinases by leukemia inhibitory factor through gp130 in cardiac myocytes. *Circulation* 1996;94:2626-32.
28. Craig R, Wagner M, McCardle T, Craig AG, Glembotski CC. The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 2001;276:37621-9.

29. Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:298-303.
30. Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Cytokines and their receptors in cardiovascular diseases--role of gp130 signalling pathway in cardiac myocyte growth and maintenance. *Int J Exp Pathol* 2000;81:1-16.
31. Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res* 2010;61:269-80.
32. Nakafuku M, Satoh T, Kaziro Y. Differentiation factors, including nerve growth factor, fibroblast growth factor, and interleukin-6, induce an accumulation of an active Ras.GTP complex in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 1992;267:19448-54.
33. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic Res Cardiol* 2007;102:279-97.
34. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 1998;83:345-52.
35. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:211-8.
36. Downward J, Goff SP. Update on The Big C: complexity and cross-talk between pathways. *Current Opinion in Genetics & Development* 2002;12:11-3.
37. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000;19:6341-50.
38. Yue TL, Gu JL, Wang C, et al. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2000;275:37895-901.
39. Allen LF, Sebolt-Leopold J, Meyer MB. CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin Oncol* 2003;30:105-16.
40. Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:38-48.
41. Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:79-100.

42. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:449-71.
43. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:751-9.
44. Latronico MV, Costinean S, Lavitrano ML, Peschle C, Condorelli G. Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1015:250-60.
45. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994;370:527-32.
46. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905-27.
47. Bellacosa A, Franke TF, Gonzalez-Portal ME, et al. Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* 1993;8:745-54.
48. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697:3-16.
49. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996;15:6541-51.
50. Alessi DR. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans* 2001;29:1-14.
51. Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 1998;8:684-91.
52. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 1998;396:584-7.
53. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098-101.
54. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* 2002;22:6247-60.
55. Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 2000;275:8271-4.

56. Chan TO, Tsichlis PN. PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE* 2001;2001:pe1.
57. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-41.
58. Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 2003;87:1427-35.
59. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003;116:1175-86.
60. Force T, Woodgett JR. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J Biol Chem* 2009;284:9643-7.
61. Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 2002;90:1055-63.
62. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-9.
63. Haq S, Choukroun G, Kang ZB, et al. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 2000;151:117-30.
64. Miura T, Miki T. GSK-3beta, a therapeutic target for cardiomyocyte protection. *Circ J* 2009;73:1184-92.
65. Lee CH, Inoki K, Guan KL. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:443-67.
66. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:21-35.
67. Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 2003;11:1457-66.
68. Cai SL, Tee AR, Short JD, et al. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* 2006;173:279-89.
69. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 2005;15:702-13.
70. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005;121:179-93.

71. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 2006;126:955-68.
72. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 2007;9:316-23.
73. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 1998;273:3963-6.
74. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002;16:1472-87.
75. Hara K, Maruki Y, Long X, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177-89.
76. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163-75.
77. Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB, Hannan RD, Pearson RB. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors* 2007;25:209-26.
78. Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:155-62.
79. Pullen N, Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 1997;410:78-82.
80. Iijima Y, Laser M, Shiraishi H, et al. c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277:23065-75.
81. Cheatham L, Monfar M, Chou MM, Blenis J. Structural and functional analysis of pp70S6k. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11696-700.
82. Thomas G. An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat Cell Biol* 2000;2:E71-2.
83. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:307-18.
84. Redpath NT, Foulstone EJ, Proud CG. Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signalling pathway. *EMBO J* 1996;15:2291-7.

85. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:2108-18.
86. Buss SJ, Riffel JH, Malekar P, et al. Chronic Akt blockade aggravates pathological hypertrophy and inhibits physiological hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H420-30.
87. Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* 2004;94:884-91.
88. Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, Freedman LP. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol* 2007;213:610-7.
89. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87:905-31.
90. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 2006;20:1996-2009.
91. Arias-Loza PA, Jazbutyte V, Pelzer T. Genetic and pharmacologic strategies to determine the function of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in cardiovascular system. *Gend Med* 2008;5 Suppl A:S34-45.
92. Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 1995;9:814-25.
93. Kelly MJ, Wagner EJ. Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:369-74.
94. Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* 2002;53:709-19.
95. Matthews J, Wihlen B, Tujague M, Wan J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol* 2006;20:534-43.
96. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997;416:107-12.

97. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Levin ER. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem* 2005;280:26339-48.
98. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, et al. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H469-76.
99. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, et al. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J* 2006;20:926-34.
100. Fan M, Bigsby RM, Nephew KP. The NEDD8 pathway is required for proteasome-mediated degradation of human estrogen receptor (ER)-alpha and essential for the antiproliferative activity of ICI 182,780 in ERalpha-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2003;17:356-65.
101. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol* 2014;389:71-83.
102. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003;278:2701-12.
103. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002;295:2465-8.
104. Yadav Y, Maclean ED, Bhattacharyya A, et al. Design, synthesis and bioevaluation of novel candidate selective estrogen receptor modulators. *Eur J Med Chem* 2011.
105. Murphy E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res* 2011;109:687-96.
106. Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, et al. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis* 1990;10:1051-7.
107. van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2001;104:1419-23.
108. Hale SL, Birnbaum Y, Kloner RA. beta-Estradiol, but not alpha-estradiol, reduced myocardial necrosis in rabbits after ischemia and reperfusion. *Am Heart J* 1996;132:258-62.

109. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14783-8.
110. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res* 2004;95:692-9.
111. Wu CH, Liu JY, Wu JP, et al. 17beta-estradiol reduces cardiac hypertrophy mediated through the up-regulation of PI3K/Akt and the suppression of calcineurin/NF-AT3 signaling pathways in rats. *Life Sci* 2005;78:347-56.
112. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270:1491-4.
113. Donaldson C, Eder S, Baker C, et al. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. *Circ Res* 2009;104:265-75, 11p following 75.
114. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2979-84.
115. Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart* 2012;98:5-10.
116. Squires MS, Nixon PM, Cook SJ. Cell-cycle arrest by PD184352 requires inhibition of extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 but not ERK5/BMK1. *Biochem J* 2002;366:673-80.
117. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H823-9.
118. Gurgun D, Hegner B, Kusch A, et al. Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Hypertension* 2011;57:648-54.
119. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:2496-500.

120. Wilden PA, Agazie YM, Kaufman R, Halenda SP. ATP-stimulated smooth muscle cell proliferation requires independent ERK and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol* 1998;275:H1209-15.
121. Lin K, Lin J, Wu WI, et al. An ATP-Site On-Off Switch That Restricts Phosphatase Accessibility of Akt. *Sci Signal* 2012;5:ra37.
122. Tokunaga C, Yoshino K, Yonezawa K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:443-6.
123. Peyrollier K, Hajduch E, Blair AS, Hyde R, Hundal HS. L-leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of system A amino acid transport. *Biochem J* 2000;350 Pt 2:361-8.
124. Ono Y, Ito H, Tamamori M, et al. Role and relation of p70 S6 and extracellular signal-regulated kinases in the phenotypic changes of hypertrophy of cardiac myocytes. *Jpn Circ J* 2000;64:695-700.
125. Hegner B, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Hypertens* 2005;23:1191-202.
126. Ciccone NA, Xu S, Lacza CT, Carroll RS, Kaiser UB. Frequency-dependent regulation of follicle-stimulating hormone beta by pulsatile gonadotropin-releasing hormone is mediated by functional antagonism of bZIP transcription factors. *Mol Cell Biol* 2010;30:1028-40.
127. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 1991;47:155-87; discussion 88-9.
128. Hatae J, Takami N, Lin H, Honda A, Inoue R. 17beta-Estradiol-induced enhancement of estrogen receptor biosynthesis via MAPK pathway in mouse skeletal muscle myoblasts. *J Physiol Sci* 2009;59:181-90.
129. Jiang GL, White CR, Stevens HY, Frangos JA. Temporal gradients in shear stimulate osteoblastic proliferation via ERK1/2 and retinoblastoma protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E383-9.
130. Sussman MA, McCulloch A, Borg TK. Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2002;91:888-98.

131. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:8-14.
132. Zhang Z, Maier B, Santen RJ, Song RX. Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:926-33.
133. Recchia AG, De Francesco EM, Vivacqua A, et al. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2011;286:10773-82.
134. Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Meyer R, Vetter H, Grohe C. Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* 1999;454:271-6.
135. Cao J, Zhu T, Lu L, et al. Estrogen induces cardioprotection in male C57BL/6J mice after acute myocardial infarction via decreased activity of matrix metalloproteinase-9 and increased Akt-Bcl-2 anti-apoptotic signaling. *Int J Mol Med* 2011;28:231-7.
136. Satoh M, Matter CM, Ogita H, et al. Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1 and prevention of congestive heart failure by estrogen. *Circulation* 2007;115:3197-204.
137. Miyazaki M, McCarthy JJ, Fedele MJ, Esser KA. Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *J Physiol* 2011;589:1831-46.
138. Tee AR, Anjum R, Blenis J. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberlin. *J Biol Chem* 2003;278:37288-96.
139. Jaster R, Bittorf T, Markewitz M, Selig G, Brock J. Erythropoietin induces biphasic activation of p70S6k: evidence for a different regulation of early and late phase of activation. *Cell Signal* 1995;7:325-30.
140. Yu J, Henske EP. Estrogen-induced activation of mammalian target of rapamycin is mediated via tuberlin and the small GTPase Ras homologue enriched in brain. *Cancer Res* 2006;66:9461-6.

141. Hornberger TA, Armstrong DD, Koh TJ, Burkholder TJ, Esser KA. Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C185-94.
142. Sugden PH. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res* 2003;93:1179-92.
143. Nakatani K, Horinouchi J, Yabu Y, Wada H, Nobori T. Expression of endothelial nitric oxide synthase is induced by estrogen with glycogen synthase 3beta phosphorylation in MCF-7 cells. *Oncol Rep* 2004;12:833-6.
144. Sugden PH, Fuller SJ, Weiss SC, Clerk A. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S137-53.
145. Wang L, Wang X, Proud CG. Activation of mRNA translation in rat cardiac myocytes by insulin involves multiple rapamycin-sensitive steps. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1056-68.
146. Markou T, Cullingford TE, Giraldo A, et al. Glycogen synthase kinases 3alpha and 3beta in cardiac myocytes: regulation and consequences of their inhibition. *Cell Signal* 2008;20:206-18.
147. Zhai P, Gao S, Holle E, et al. Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 2007;282:33181-91.
148. Hirotani S, Zhai P, Tomita H, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective. *Circ Res* 2007;101:1164-74.
149. Huang C, Gu H, Wang Y, Wang M. Estrogen-induced SDF-1 production is mediated by estrogen receptor-alpha in female hearts after acute ischemia and reperfusion. *Surgery* 2011;150:197-203.
150. Kilic A, Javadov S, Karmazyn M. Estrogen exerts concentration-dependent pro- and anti-hypertrophic effects on adult cultured ventricular myocytes. Role of NHE-1 in estrogen-induced hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:360-9.
151. Kanbe Y, Kim MH, Nishimoto M, et al. Newly discovered orally active pure antiestrogens. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:4959-64.
152. Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res* 2012;28:71-6.

153. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009;74:622-7.
154. Sudhagar S, Sathya S, Lakshmi BS. Rapid non-genomic signalling by 17beta-oestradiol through c-Src involves mTOR-dependent expression of HIF-1alpha in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2011;105:953-60.
155. 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;407:538-41.
156. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 2000;275:18447-53.
157. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, Brodt ZN, Murphy CJ, Holz MK. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 2009;284:6361-9.
158. Lavandero S, Foncea R, Perez V, Sapag-Hagar M. Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1-induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *FEBS Lett* 1998;422:193-6.
159. Scheinowitz M, Abramov D, Eldar M. The role of insulin-like and basic fibroblast growth factors on ischemic and infarcted myocardium: a mini review. *Int J Cardiol* 1997;59:1-5.
160. Suleiman MS, Singh RJ, Stewart CE. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I. *Pharmacol Ther* 2007;114:278-94.
161. Koricanac G, Tepavcevic S, Zakula Z, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Isenovic ER. Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase. *Eur J Pharmacol* 2011;655:23-30.
162. Markou T, Barlaka E, Bartucci M, Lazou A. Signal transduction pathways through cytoprotective, apoptotic and hypertrophic stimuli: a comparative study in adult cardiac myocytes. *Cell Biochem Funct* 2011;29:442-51.
163. Kawahara Y, Tanonaka K, Arino T, et al. Effects of tanshinone VI on insulin-like growth factor-1-induced hypertrophy of isolated cardiomyocytes from neonatal rats. *Exp Clin Cardiol* 2004;9:165-8.
164. Natalicchio A, Laviola L, De Tullio C, et al. Role of the p66Shc isoform in insulin-like growth factor I receptor signaling through MEK/Erk and regulation of actin cytoskeleton in rat myoblasts. *J Biol Chem* 2004;279:43900-9.

165. Rocchi S, Tartare-Deckert S, Mothe I, Van Obberghen E. Identification by mutation of the tyrosine residues in the insulin receptor substrate-1 affecting association with the tyrosine phosphatase 2C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology* 1995;136:5291-7.
166. Delaney AM, Printen JA, Chen H, Fauman EB, Dudley DT. Identification of a novel mitogen-activated protein kinase kinase activation domain recognized by the inhibitor PD 184352. *Mol Cell Biol* 2002;22:7593-602.
167. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999;5:810-6.
168. Borisov N, Aksamitiene E, Kiyatkin A, et al. Systems-level interactions between insulin-EGF networks amplify mitogenic signaling. *Mol Syst Biol* 2009;5:256.
169. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, et al. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 1999;286:1738-41.
170. Dalle Pezze P, Sonntag AG, Thien A, et al. A dynamic network model of mTOR signaling reveals TSC-independent mTORC2 regulation. *Sci Signal* 2012;5:ra25.
171. Ruf S, Piper M, Schluter KD. Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Pflugers Arch* 2002;443:483-90.
172. Meyer MR, Baretella O, Prossnitz ER, Barton M. Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology* 2010;86:58-64.
173. Etique N, Flament S, Lecomte J, Grillier-Vuissoz I. Ethanol-induced ligand-independent activation of ERalpha mediated by cyclic AMP/PKA signaling pathway: an in vitro study on MCF-7 breast cancer cells. *Int J Oncol* 2007;31:1509-18.
174. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997;272:31515-24.
175. Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN. Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett* 2006;580:3051-8.
176. Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, et al. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res* 2001;88:1020-7.
177. Badve S, Collins NR, Bhat-Nakshatri P, et al. Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor- and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications. *Am J Pathol* 2010;176:2139-49.

178. Nagoshi T, Matsui T, Aoyama T, et al. PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115:2128-38.
179. Schnabel P, Mies F, Nohr T, Geisler M, Bohm M. Differential regulation of phospholipase C-beta isozymes in cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:1-6.
180. Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1261-9.
181. Wusteman MC, Pegg DE, Robinson MP, Wang LH, Fitch P. Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties. *Cryobiology* 2002;44:24-37.
182. Liseth K, Abrahamsen JF, Bjorsvik S, Grottebo K, Bruserud O. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cytotherapy* 2005;7:328-33.
183. Teos LY, Zhao A, Alvin Z, Laurence GG, Li C, Haddad GE. Basal and IGF-I-dependent regulation of potassium channels by MAP kinases and PI3-kinase during eccentric cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1834-45.
184. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. *J Card Fail* 2008;14:245-53.
185. Haddad F, Adams GR. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. *J Appl Physiol* 2004;96:203-10.
186. Giunta M, Rigamonti AE, Bonomo SM, et al. Estrogens Need Igf-1 Cooperation to Exert Their Neuroprotective Effects in Postmenopausal Women. *J Endocrinol Invest* 2012.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maria Utta Schmidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel *Einfluss von Östrogen auf den Akt/mTOR- und Erk-Signalweg bei adaptiver Herzhypertrophie in vitro* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Maria Utta Schmidt hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Angelika Kusch, Maria Schmidt, Daniel Postpieszala, Rusan Catar, Björn Hegner, Dennis Gürgen, Duska Dragun. 2014. 17 β -estradiol regulates mTORC2 sensitivity to rapamycin in adaptive cardiac remodeling. Aktuell under peer Review at PLOS ONE.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Studienexperimenten sowie –auswertungen und –analysen, Beteiligung an der Diskussion des Papers.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationen

Angelika Kusch, Maria Schmidt, Daniel Postpieszala, Rusan Catar, Björn Hegner, Dennis Gürgen, Duska Dragun. 2014. *17 β -estradiol regulates mTORC2 sensitivity to rapamycin in adaptive cardiac remodeling*. Eingereicht bei PLOS ONE am 03.09.2014, zum Zeitpunkt der Eröffnung des Promotionsverfahrens under peer Review.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Duska Dragun möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Darüber hinaus gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe dafür, dass ich als "Laborneuling" offen und hilfsbereit in das Team aufgenommen wurde. Marc Eigen danke ich dabei insbesondere für die geduldige Einarbeitung genauso wie die über das rein Fachliche hinaus reichenden Gespräche im Verlauf.

In Frau Dr. med. Angelika Kusch hatte ich eine Betreuerin wie man sie sich als Doktorandin nicht besser wünschen kann. Neben ihrer fachlichen Expertise bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche danke ich ihr für ihre Unterstützung, auf die ich stets vertrauen konnte, sowie die unermüdlichen Zwischenkorrekturen der Dissertation und die ehrlichen Worte, die mich Schritt für Schritt sowohl inhaltlich als auch formal zum Ziel geführt haben. Trotz ihres stets ausgefüllten Laboralltags und unserer räumlichen Distanz im Verlauf blieb sie mir als zuverlässige Ansprechpartnerin erhalten und engagierte sich für mich. Vielen Dank auch für die Gespräche im zwischenmenschlichen Bereich. Sehr gerne denke ich an gemeinsam besuchte Kongresse, insbesondere die Jahrestagung der DGK, zurück. Danke Angelika, ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.