

**Aus dem Kardiovaskulären Forschungszentrum CCR /
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gesellschaft
Molekulare Muskelphysiologie
Prof. Dr. Ingo Morano**

HABILITATIONSSCHRIFT

**Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Östrogen und
Östrogenrezeptor-alpha im Herzen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Shokoufeh Mahmoodzadeh

Eingereicht: März 2017
Dekan: Prof. Dr. Axel R. Pries
1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen
2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Maack, Würzburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
1. Einleitung	6
1.1. Der Einfluss von Östrogen auf die Entwicklung kardiovaskulären Erkrankungen	7
1.2. Östrogenrezeptoren.....	8
1.2.1. Struktur und Aufbau der Östrogenrezeptoren	8
1.2.2. Molekulare Mechanismen der Östrogenrezeptor-Signalwege	10
1.2.2.1. Liganden-abhängige Signalwege	10
1.2.2.2. Liganden-unabhängige Signalwege	12
1.2.3. Östrogenrezeptoren und deren Ko-Regulatoren	12
1.3. Wirkung von Östrogenrezeptoren auf das Herz	13
1.4. Zielstellung	18
2. Eigene Arbeiten	19
2.1. Erhöhte ER Expression in den Herzen von Patienten mit Aortenstenose	19
2.2. Krankheitsabhängige Regulation kardialer Expression und Lokalisation des ER α bei Patienten mit Herzinsuffizienz	28
2.3. Wechselseitige Regulation der ER α Transkription durch NF- <i>k</i> B und E2-Signalwege im humanen Herzen.....	39
2.4. 17 β -Östradiol-induzierte Interaktion des ER α mit NPPA reguliert die Genexpression der E2-Zielgene im humanen Herzen.....	51
2.5. 17 β -Östradiol-induzierte Interaktion des ER α mit ALC-1 reguliert die genomischen und nicht-genomischen ER α -Wirkungen im Herzen	64
2.6. Überexpression von ER α in weiblichen murinen Kardiomyozyten erhöht die Angiogenese und Lymphangiogenese und reduziert die kardiale Fibrose nach einem Myokardinfarkt.....	81
3. Diskussion	93
3.1. Expression, Lokalisation und krankheitsabhängige Regulation von ER α im humanen Herzen.....	93
3.2. Identifizierung und funktionelle Analyse neuer Ko-Regulatoren von ER α im humanen Herzen.....	98
3.2.1 Funktionelle Bedeutung der Interaktion von ER α und NPPA im humanen Herzen	99
3.2.2. Funktionelle Bedeutung der Interaktion von ER α und ALC-1 im Herzen .	100
3.3. In vivo Analyse der Rolle von ER α in einem transgenen Mausmodell mit Kardiomyozyten-spezifischen ER α -Überexpression	102
4. Zusammenfassung und Ausblicke	106

5.	Literaturverzeichnis.....	108
6.	Danksagung	122
7.	Erklärung.....	124

Abkürzungen

5'-RACE PCR	<i>Rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction</i>
5'-UTR	5'-nicht-translatierte Region
Adv	Adenovirus
AF-1	N-terminale Liganden-unabhängige Transaktivierungsdomäne
AF-2	C-terminale Liganden-abhängige Transaktivierungsdomäne
AKT	Protein kinase B, PKB
ALC-1	Atriale essentielle leichte Myosinkette
AngII	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches peptid
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
AS	Aortenklappenstenose
BNP	B-type natriuretisches peptid
bp	Basenpaar
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP/p300	CREB-bindendes Protein und p300 Ko-Aktivator Familie
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
COL1A1	Kollagen-Type I, alpha 1
COL3A1	Kollagen-Type III, Alpha 1
CoRNR	<i>Corepressor-nuclear receptor box</i>
Cx43	Connexin 43
DBD	DNA-bindende Domäne
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
E1	Estrone
E2	17 β -Östradiol, Östrogen
E3	Estriol
EGF-R	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ER	Östrogenrezeptor
ERE	<i>Estrogen Response Element</i>
ERK1/2	<i>Extracellular-signal-related kinases 1/2</i>
ERKO	Östrogenrezeptor-alpha Knockout
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER α -OE	Kardiomyozyten-spezifische ER α -Überexpression
ER β	Östrogenrezeptor beta
ET-1	Endothelin 1
GF	Wachstumsfaktoren
HDAC	Histon-Deacetylase
HERS I/II	<i>Heart and estrogen/progestin Replacement study I and II</i>
HET	Hormonersatztherapie
I/R	Ischämie/Reperfusion
IGF-R	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor
I κ B	<i>Inhibitor of KB</i>
kDa	Kilodalton
LBD	Liganden-bindende Domäne
LCoR	<i>Ligand-dependent corepressor</i>

LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMP2	<i>Matrix-Metalloproteinase-2</i>
MRF-1	<i>Modulator Recognition Factor-1</i>
MTA	<i>Metastasis associated factor</i>
MyHC	<i>Myosin schwere-Kette Isoform C</i>
NCoR	<i>Nuclear Receptor Co-Repressor</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NPPA	<i>Präkursor des atrialen natriuretischen Peptids</i>
NR3A1	<i>Östrogenrezeptor alpha Gen</i>
NR3A2	<i>Östrogenrezeptor beta Gen</i>
PELP1	<i>Proline, glutamic acid, leucine-rich protein 1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPT	<i>4,4', 4''- (4-Propyl- (1H) -pyrazol-1,3,5- Triyl) trisphenol</i>
REA	<i>Repressor of ER activity</i>
RIP-140	<i>Receptor-interacting Protein-140</i>
SMART	<i>Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors</i>
SP-1	<i>Specificity protein-1</i>
SRA	<i>Steroid-RNA-Aktivator</i>
SRC/p160	<i>p160 Steroidrezeptor Ko-Aktivator Familie</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable complex</i>
TAC	<i>Transversale Aortale Konstriktion</i>
TF	<i>Transkriptionsfaktor</i>
TNF α	<i>Tumornekrosefaktor-α</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLC-1	<i>Ventrikuläre essentielle leichte Myosinkette</i>
WHI	<i>Women's Health Initiative study</i>
Y2H	<i>Yeast-Two-Hybrid Assay</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1 Protein</i>
α -MHC	<i>α-Myosin schwere-Kette</i>

1. Einleitung

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind seit vielen Jahren die Haupttodesursache in westlichen Industrienationen. Epidemiologische Studien weisen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Inzidenz und Mortalität der Herzerkrankungen nach [1-4]. Vor der Menopause haben Frauen ein signifikant geringeres Mortalitätsrisiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Vergleich zu gleichaltrigen Männern. Mit Eintritt der Menopause ist bei Frauen jedoch das Risiko, an einer Herzerkrankung zu erkranken, wesentlich höher als bei gleichaltrigen Männern [5, 6].

Chronische hämodynamische Überlastungen, wie z.B. bei der arteriellen Hypertonie oder Aortenstenose, führen zu Myokardhypertrophie und später Herzinsuffizienz. Hierbei entwickeln Frauen bei Druckbelastung eher eine konzentrische Hypertrophie und eine diastolische Funktionsstörung, wohingegen Männer eher eine Dilatation und eine systolische Funktionsstörung entwickeln [7-10]. Frauen mit nicht-ischämischer Ätiologie der Herzinsuffizienz zeigen eine höhere Ausstoßfraktion (*ejection fraction*) und eine bessere Überlebensrate als nicht-ischämische Männer [11, 12]. Auch die Entstehung und Progression von Fibrose läuft im männlichen und weiblichen Herzen unterschiedlich. Weibliche Patienten mit Herzerkrankungen wie Aortenstenose, koronare Herzerkrankung und Atherosklerose zeigen eine geringere Aktivierung pro-fibrotischer Gene sowie inflammatorischer Marker und folglich eine geringere Fibrose im Herzen im Vergleich zu männlichen Patienten [10, 13-16]. Frauen zeigen auch beim ventrikulären „*Remodelling*“ (ventrikuläre Umbauprozesse im Herzen) nach einem Myokardinfarkt histologisch nachweisbar weniger Apoptose und Myokardzellnekrosen im Vergleich zu Männern [17].

Tierexperimentelle Untersuchungen bestätigen die Existenz von Geschlechterunterschieden bei kardiovaskulären Erkrankungen. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass nach experimenteller transverser aortaler Konstriktion (TAC) die Entwicklung der kardialen Hypertrophie in den männlichen Mäusen ausgeprägter war als in den weiblichen Mäusen, welche mit einer stärkeren Zunahme der Kardiomyozytengröße (Kardiomyozytenhypertrophie), einer höheren Fibrose-Entwicklung sowie einer vermehrten pro-fibrotischen Genexpression einherging [18-20]. In Mausmodellen nach experimentellem Myokardinfarkt konnte ebenfalls gezeigt

werden, dass weibliche Mäuse eine bessere Prognose hatten als männliche Mäuse. Als Reaktion auf Myokardinfarkt zeigten die männlichen Mäuseherzen ein ausgeprägtes maladaptives Remodeling mit stark dilatiertem linken Ventrikel und beeinträchtigter linksventrikulärer Funktion im Vergleich zu weiblichen Mäusen [21-23].

Diese Daten zusammen führten zu der Annahme, dass das weibliche Sexualhormon Östrogen eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Geschlechterunterschiede in der Pathogenese des Herzen spielen kann.

1.1. Der Einfluss von Östrogen auf die Entwicklung kardiovaskulären Erkrankungen

Die natürlich vorkommenden Östrogene 17 β -Östradiol (E2), Estrone (E1) und Estriol (E3) sind C18-Steroide, die sich von Cholesterin ableiten [24], wobei E2 das biologisch wirksamste Östrogen ist [25]. E2 wird überwiegend im Ovar und der Plazenta und in geringen Mengen in den Nebennieren und Hoden synthetisiert. Außerhalb der reproduktiven Systeme kann E2, wenn auch in geringeren Mengen, durch die Aromatisierung von Androgenen auch im Fett- und neuronalem Gewebe sowie in Brust und Knochen und im kardiovaskulären System gebildet werden [26, 27]. Östrogene sind an der Regulation wichtiger physiologischer Prozesse wie der Reproduktion, des Zellwachstums, des Fett- und Knochenstoffwechsels und den kardiovaskulären und neuronalen Aktivitäten beteiligt [28-30]. Neben physiologischen Effekten beeinflussen Östrogene aber auch pathologische Prozesse, u. a., im kardiovaskulären System [31].

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Östrogendefizit in ovariectomierten Ratten die Herzhypertrophie fördert und eine Östrogensubstitution diesen Effekt revidiert [32]. In ovariectomierten Mäusen mit induzierter Druckbelastung (TAC) bewirkte eine E2-Zugabe eine 30%-ige Reduktion der druckinduzierten Hypertrophie gegenüber den Mäusen mit Placebo-Gabe [33]. In Mäusen mit induziertem Myokardinfarkt führte die Zugabe von E2 zu einer Reduktion der Infarktgröße und der Kardiomyozyten-Apoptose in der Infarktzone und Randzone (Peri-Infarktzone) der Myokardnarbe [34]. Pedram *et al.* [35] demonstrierten in einer *in vitro* Studie, dass E2 eine hemmende Wirkung auf die Angiotensin II- (AngII) und Endothelin 1 (Et-1)-induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten hat.

Obwohl zahlreiche tierexperimentelle Studien zeigten, dass E2 in der Pathogenese der Herzerkrankungen eine protektive Rolle spielt, werden aktuell die Gabe von E2- und konjugierten E2-Präparaten im Rahmen der Hormonersatztherapie (HET)-Studien aufgrund erhöhtes Auftretens eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms, eines Herzinfarktes oder Schlaganfalls sowie thromboembolischer Ereignisse kontrovers diskutiert. Beobachtungsstudien und die *Nurses Health Study* zeigten, dass postmenopausale Frauen, die eine HET erhielten, eine niedrigere Rate kardiovaskulärer Erkrankungen aufwiesen, als diejenigen, die keine HET bekamen [36-39]. Im Gegensatz dazu haben die *Women's Health Initiative* Studie (WHI) und *Heart and Estrogen/Progestin Replacement* Studien (HERS I und II) gezeigt, dass HET keine positive Wirkung auf kardiovaskuläre Erkrankungen hat. Im Gegenteil, sie erhöhte sogar bei postmenopausalen Frauen das Risiko eine Herzerkrankung zu entwickeln [40-44]. Die bisherigen Misserfolge und widersprüchlichen Ergebnisse der HET demonstrieren deutlich, dass detaillierte Kenntnisse über die Funktion von E2 und Östrogenrezeptoren (ER) und die molekularen Wirkmechanismen E2-induzierter ER-Aktivierung im humanen Herzen nicht zur Genüge untersucht sind.

1.2. Östrogenrezeptoren

E2 vermittelt seine biologischen Effekte überwiegend über die Östrogenrezeptoren alpha und beta (ER α und ER β). Der erste Östrogenrezeptor, der heute als ER α bekannt ist, wurde 1986 als ein E2-bindender Rezeptor kloniert [45, 46]. Einige Jahre später erfolgte die Klonierung des ER β in verschiedenen Spezies [47-49]. ER α und ER β werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert, die auf verschiedenen Chromosomen liegen. Das humane ER α Gen (NR3A1) liegt auf Chromosom 6q und kodiert ein Protein mit 595 Aminosäuren (66 kDa); das humane ER β Gen (NR3A2) liegt auf Chromosom 14q und kodiert ein Protein mit 530 Aminosäuren (55 kDa) [50, 51]. Beide Rezeptoren zeigen eine hohe Sequenzhomologie und eine ähnliche Bindungsaffinität zu E2.

1.2.1. Struktur und Aufbau der Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren gehören zur Klasse I Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Alle nukleären Rezeptoren haben einen ähnlichen Aufbau und sind in 6 funktionelle Domänen eingeteilt [52-55]. Die N-terminale A/B-Domäne ist in der

Aminosäuresequenz und Länge sehr variabel und besitzt eine Liganden-unabhängige Transaktivierungsfunktion (AF1). Die A/B-Domäne kann durch verschiedene Kinasen, unter anderem MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*) und PI3K (*Phosphoinositide-3-Kinase*)/AKT (*Protein kinase B*) Kaskaden, phosphoryliert werden [56-59]. So aktivierter ER kann durch Interaktion mit Ko-Regulatoren oder mit der basalen Transkriptionsmaschinerie zellspezifisch die Expression von Zielgenen regulieren [60, 61].

Die hoch konservierte DNA-bindende Domäne (C-Domäne; DBD) enthält zwei Zinkfinger-Motive, welche einerseits die Dimerisierung des Rezeptors, und andererseits die Bindung des Rezeptors an spezifische DNA-Sequenzen (sog. *Estrogen Response Element* (ERE)), innerhalb der Zielgenpromotoren bewirken [62-64].

Die variable D-Domäne (Hing-Domäne) spielt bei der Dimerisierung und Kerntranslokation der Rezeptoren eine Rolle und enthält auch Bereiche für die Bindungen der Ko-Regulatoren [47].

Die C-terminale Liganden-bindende Domäne (LBD, E-Domäne) besteht aus zwölf α -Helices (H1 bis H12), deren Lage zu einander durch die Ligandenbindung verändert wird [65]. Die Helices 3, 6, 8 und 11 der LBD bilden eine hydrophobe Tasche, in der alle Liganden binden [66]. Die Ligandenbindung (je nach Ligand: Östrogen, Agonist oder Antagonist) löst eine spezifische Veränderung der Konformation des Rezeptors (Liganden-abhängige Konformationsänderung) aus. In Helix 12 (H12) befindet sich eine innerhalb der nukleären Rezeptoren hochkonservierte zweite Liganden-abhängige Transaktivierungsfunktion (AF-2 Domäne), welche für Liganden-abhängige Transaktivierungen und Rekrutierungen von Ko-Regulatoren (Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren) notwendig ist [67, 68]. Die kristallographischen Untersuchungen des Östrogen- oder Agonisten-gebundenen ER zeigten, dass es hierbei zu einer Konformationsänderung der LBD kommt, bei der H12 die hydrophobe Bindungstasche verschließt, was zu einem Einschluss des Liganden führt [66, 69, 70]. Diese Konformationsänderung führt zu einer Dissoziation der Hitzeschockproteine vom Rezeptor, einer Rezeptor-Dimerisierung, der Bildung einer funktionellen AF-2 und einer Interaktion des Rezeptors mit Ko-Regulatoren und den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie [65, 71]. Dahingegen führt die Bindung eines Antagonisten dazu, dass sich H12 um 110° innerhalb des LBD dreht [72], und dabei die

Bindungsstelle für Ko-Aktivatoren besetzt, wodurch die Rekrutierung weiterer Ko-Aktivatoren verhindert wird [71]. Hierbei wird keine funktionelle AF-2 generiert und somit kann die hydrophobe Bindungstasche nicht vollständig verschlossen werden [72].

Am Ende des C-Terminus liegt die F-Domäne. Die Funktion dieser Domäne ist nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass die F-Domäne eine inhibierende Wirkung auf die E-Domäne ausübt und somit deren Aktivität kontrolliert [73]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass diese Domäne bei der Selektion der Liganden (Agonisten, Antagonisten) und der Halbwertszeit der Rezeptoren (proteasomale Degradierung) eine Rolle spielt [74-76].

1.2.2. Molekulare Mechanismen der Östrogenrezeptor-Signalwege

Östrogenrezeptoren können hauptsächlich über 2 unterschiedlichen Signalwege in die zellulären Prozesse eingreifen: 1) Liganden-abhängige und 2) Liganden-unabhängige Signalwege (Abbildung 1).

1.2.2.1. Liganden-abhängige Signalwege

Hierbei wird zwischen den Liganden-abhängigen genomischen und nicht-genomischen Östrogenrezeptor-Signalwegen unterschieden.

Über die genomischen Signalwege reguliert der mit E2-aktivierte ER entweder direkt (klassisch) oder indirekt (*tethered*) die Expression von E2-Zielgenen. Die Bindung des E2 an den ER führt zu einer Dissoziation der Hitzeschockproteine vom Rezeptor, gefolgt von einer ER-Dimerisierung (als Homo- oder Heterodimere) und schließlich nukleärer Translokation der Dimere. Beim klassischen Signalweg binden diese Rezeptor-Dimere über ihre DBD direkt ein spezielles palindromisches DNA Motiv innerhalb der E2-Zielpromotoren mit der Konsensus-Sequenz 5'-A(G/A)GTCA_nTTGACC(T/C)-3' (n = beliebige Nukleotide), sog. ERE [77-79] und regulieren damit die Transkription der Zielgene (Abbildung 1.I) [61, 80]. Beim indirekten Signalweg können E2-aktivierte ER mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 (*Activator-Protein-1*), NF- κ B (*Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) oder SP1 (*Specificity Protein 1*), welche bereits an den Promotoren der E2-Zielgene gebunden sind, interagieren und so die Transkription von Zielgenen, deren Promotoren keine ERE aufweisen, modulieren (Abbildung 1.II) [52, 81-83]. Darüber hinaus können E2-aktivierte ER

verschiedene zytosolische Signalkaskaden (z.B. ERK1/2 (*Extracellular-signal-Related Kinases 1/2*)/MAPK, p38/MAPK, PI3K/AKT) aktivieren, die wiederum ER oder andere beteiligte Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, und damit die Expression der E2-Zielgenen modulieren (Abbildung 1.III) [58, 84-89].

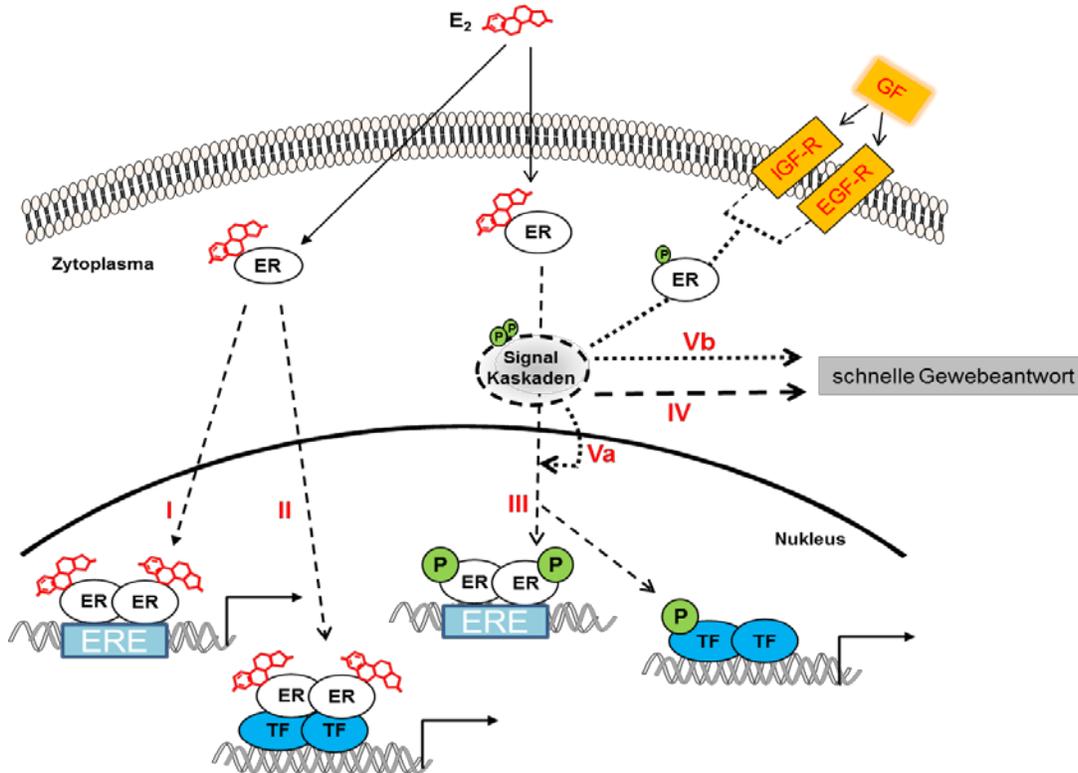


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Liganden-abhängigen und Liganden-unabhängigen ER-Signalwege. I) Klassischer (direkter) Liganden-abhängiger genomischer ER-Signalweg, II) Indirekter Liganden-abhängiger genomischer ER-Signalweg (*tethering*), III) Indirekter Liganden-abhängiger genomischer ER-Signalweg (Phosphorylierung), IV) Liganden-abhängiger nicht-genomischer ER-Signalweg, V) Liganden-unabhängiger genomischer (Va) und nicht-genomischer (Vb) ER-Signalweg. E₂: 17 β -Östradiol, ER: Östrogenrezeptor, TF: Transkriptionsfaktor, ERE: *estrogen response element*, P: Phosphorylierung, EGF-R: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, IGF-R: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor; GF: Wachstumsfaktoren. (Modifiziert nach [90]).

Im Gegensatz zu genomischen Signalwegen laufen die Liganden-abhängigen nicht-genomischen ER-Signalwege innerhalb weniger Sekunden oder Minuten ab und sind unabhängig von der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen. Hierbei werden die membranständigen bzw. zytoplasmatischen E₂-aktivierten ER direkt oder über mehrere

Zwischenschritte einer Reihe zytosolischer Signalkaskaden, u. a. die Adenyllylzyklase, MAPK und PI3-Kinase, durch Phosphorylierung aktivieren und damit eine schnelle Antwort der Zelle/Gewebe induzieren (Abbildung 1.IV) [80, 91, 92].

1.2.2.2. Liganden-unabhängige Signalwege

Neben den Liganden-abhängigen Signalwegen können die Liganden-freien ER durch Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermaler Wachstumsfaktoren) und IGF (Insulinähnlicher Wachstumsfaktoren) oder intrazelluläre Effektoren wie cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat) über mehrere Zwischenschritte durch Phosphorylierung aktiviert werden (Liganden-unabhängige Signalwege der ER). Es konnte gezeigt werden, dass ER nach einer IGF oder EGF Behandlung an spezifischen Serin- oder Thyrosin-Resten durch verschiedenen Kinasen, wie ERK1/2-MAPK und AKT, phosphoryliert werden und somit ebenfalls genomische und nicht-genomische Antworten auslösen können (Abbildung 1.Va-Vb) [86, 93-95].

1.2.3. Östrogenrezeptoren und deren Ko-Regulatoren

In den E2/ER Signalwegen spielen Ko-Regulatoren eine wichtige Rolle. Die ER benötigen die Ko-Regulatoren, um die Effekte von E2 effizient und spezifisch zu vermitteln. Studien in den letzten Dekaden haben gezeigt, dass Ko-Regulatoren nicht nur eine Brückenfunktion zwischen den ER und der basalen Transkriptionsmaschinerie haben, sondern auch im Komplex mit ER an zelltypspezifischen Aktionen wie Chromatin-Remodeling, Histon-Modifikationen, Transkriptionsinitiation und -elongation beteiligt sind, welche für die Regulation der Transkription von ER-Zielgenen erforderlich sind [96]. Von daher wirkt sich die Veränderung der Funktion und Expression der Ko-Regulatoren auf verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse aus, an denen E2/ER Signalwege involviert sind [81, 96]. E2-aktivierte ER nehmen eine aktive Konformation an, die es ihnen erlaubt Ko-Regulatoren zu binden. Ko-Regulatoren von ER werden in 2 Gruppen eingeteilt: Ko-Aktivatoren, welche die transkriptionelle Aktivität von ER verstärken und Ko-Repressoren, welche die transkriptionelle Aktivität von ER unterdrücken [97].

Die meisten ER/Ko-Aktivator Interaktionen werden durch sogenannte NR (*Nuclear Receptor*)-Boxen oder LXXLL-Motive (L= Leucin und X= jede beliebige Aminosäure)

innerhalb der Ko-Aktivatoren vermittelt [98, 99]. Die Bindungsoberfläche für die Ko-Aktivatoren in der LBD-Domäne der ER wird durch H3, H4, einen Teil von H5 und H12 Helixen gebildet [100]. Inzwischen sind mehr als 100 Ko-Aktivatoren von ER identifiziert worden, wie z.B. die Mitglieder der Steroidrezeptor Ko-Aktivator (SRC)/p160-Familie, die Histon-Acetyltransferase, das (CREB)-bindende Protein (CBP)/p300, die ATP-abhängige Chromatin-Remodelling-Komplexe wie SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*), die E3-Ubiquitin-Proteinligasen und der Steroid-RNA-Aktivator (SRA), welche die Wirkung von ER gewebespezifisch regulieren [101].

Ko-Repressoren hemmen die Aktivierung von ER durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. durch direkte Interaktion mit ungebundenen ER, Konkurrenz mit Ko-Aktivatoren um die DNA-Bindung, Sequestrierung von Ko-Aktivatoren durch die Bindung an LBD von ER über ihre CoRNR (*CoRepressor-Nuclear Receptor box*) bzw. NR-Boxen, Wechselwirkung mit der basalen Transkriptionsmaschinerie, DNA-Methylierung und Rekrutierung von Komplexen mit Histon-Deacetylase (HDAC) [102, 103]. Die Bindungsoberfläche für die Ko-Repressoren in der LBD-Domäne von ER wird durch bestimmte Positionierung von H3, H4 und H5 zu einander gebildet, wodurch die Bindungsoberfläche für die Ko-Aktivatoren bedeckt wird [100]. Im Gegensatz zu den Ko-Aktivatoren sind bis dato einige wenige Ko-Repressoren von ER bekannt, wie z.B. NCoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*), SMART (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors*), MRF-1 (*Modulator Recognition Factor 1*), REA (*repressor of ER activity*), RIP-140 (*Receptor-interacting Protein-140*), MTA (*metastasis associated factor*), und LCoR (*ligand-dependent corepressor*) [104, 105].

Obwohl die Beteiligung dieser Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren in der Regulation ER-vermittelter Transkription von Zielgenen bekannt ist, gibt es bislang wenig Informationen über die Prozesse, die die Rekrutierung dieser Ko-Regulatoren an ER im Herzen steuern.

1.3. Wirkung von Östrogenrezeptoren auf das Herz

Die Expression beider ER sind im humanen und Nagetier Herzen nachgewiesen [106-108]. Grohe *et al.* [106] zeigten, dass Kardiomyozyten und Fibroblasten neonataler und adulter Ratten funktionell aktive ER besitzen. Ebenfalls konnten die Expression und Verteilung sowohl von ER α als auch von ER β in atrialen und ventrikulären Geweben

weiblicher und männlicher Mäuse und Ratten gezeigt werden [107, 108]. Weitere Untersuchungen demonstrierten die Lokalisation der beiden ER-Subtypen in Sarkolemma-, Zytoplasma- und Kernfraktion von Maus und Ratten Kardiomyozyten [107, 109]. Allerdings scheint die subzelluläre Verteilung dieser Rezeptoren im Herzen unterschiedlich zu sein. Während auf dem Expressionslevel von ER β in beiden murinen Herzkammern kein Unterschied beobachtet werden konnte, zeigte ER α eine höhere Expression in den Ventrikeln im Vergleich zu den Atrien [107]. Zusätzlich zeigte diese Studie, dass die Expression von ER α am Sarkolemma wesentlich höher war als im Zytoplasma. Die Expression von ER wurde ebenfalls in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäße detektiert [110-113], wobei gezeigt werden konnte, dass die atheroprotektiven Effekte von E2 in diesen Zellen eher durch ER α vermittelt werden [111, 114, 115]. Es ist bislang nicht klar, wie die Expression und subzelluläre Lokalisation der ER im Herzen unterschiedlich reguliert werden können. Diese Unterschiede weisen jedoch bereits auf komplexe ER-Aktionen im Herzen hin.

Neben den Full-length Varianten von ER α (66 kDa) und ER β (55 kDa) sind mittlerweile auch verschiedene mRNA Spleißvarianten beider ER identifiziert worden [28, 116, 117]. Da diese Spleißvarianten häufig mit ihren Full-length-Pendants ko-exprimiert werden, wird angenommen, dass sie eine Rolle bei den physiologischen und pathologischen Prozessen in der Zelle spielen. Obwohl die genaue Funktion und potentielle Rolle dieser Varianten aufzuklären bleibt, werden die Spleißvarianten beider ER als einer der zellulären Mechanismen angesehen, die u. a. zur Regulation der Funktion von Full-length ER beitragen [28, 116]. Zum Beispiel war es Flouriot *et al.* [118] gelungen eine funktionell aktive Isoform von ER α in MCF7 Zellen (eine humane Krebs-Zelllinie) zu identifizieren, welche ca. 46 kDa groß ist. Diesem Protein fehlt das N-terminale Ende (A/B Domain) der ER α Full-length Form, und damit die Transaktivierungsfunktion AF-1. Es wurde später in anderen Geweben und Zelltypen, unter anderem im Herzen, nachgewiesen [119]. ER α -46 kDa kann als Homodimer vorliegen oder mit ER α -66 kDa einen Heterodimer bilden und somit die transkriptionelle Aktivität des ER α -66 kDa inhibieren [118]. Die Existenz funktionell aktiver Spleißvarianten von ER, welche ebenfalls zell- und gewebespezifisch reguliert werden, verkompliziert zusätzlich die Analyse der Wirkung von ER im Herzen.

Darüber hinaus ist bekannt, dass die Expression der ER selbst durch verschiedene Promotoren reguliert wird, was die Analyse der ER-Aktionen noch zusätzlich erschwert. Die Transkription des menschlichen ER α kann durch sieben verschiedene Promotorvarianten (A, B, C, D, E, F und T) eingeleitet werden, deren Transkripte sich alle in der 5'-UTR unterscheiden (Abbildung 2) [120, 121]. Alle diese ER α Transkripte initiieren an unterschiedlichen 5'-Cap-Seiten stromaufwärts von Exon 1 und spleißen an eine gemeinsame Akzeptor-Spleißstelle im Exon 1 der Protein-kodierenden Region des ER α [122].

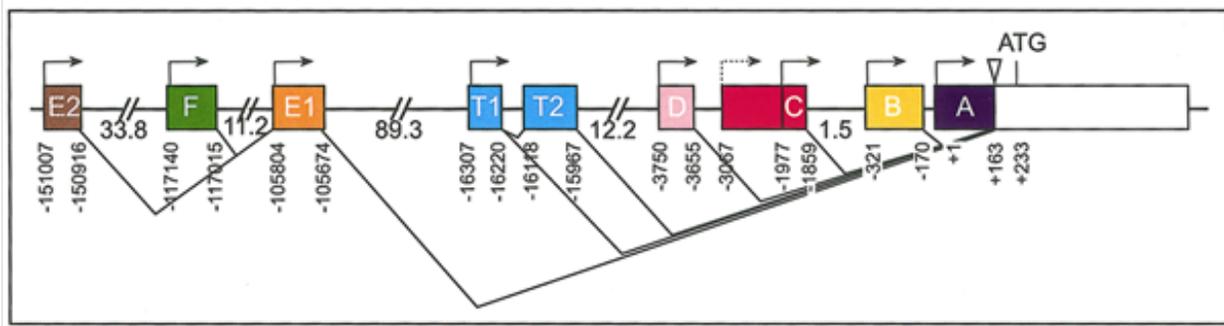


Abbildung 2: Genomische Organisation der humanen ER α Promotorregion in Anlehnung an den Vorschlag von Kos *et al.* [120]. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Promotoren (mit Pfeilen gekennzeichnet) des humanen ER α Gens und die zugehörigen 5'-nicht translatierten Exons (farbige Kästchen) mit den vorgeschlagenen Namen A-F. Die Zahlen unterhalb der Exons (5'-UTR, farbige Kästchen) präsentieren den Abstand der jeweiligen Exons von der ursprünglich beschriebenen Transkriptionsstartstelle (+1) in Basenpaaren. Die Zahlen zwischen den Exons zeigen die Größe der Introns in Kilobasenpaaren. Die gemeinsame Akzeptor-Spleißstelle in Exon 1 ist durch ein offenes Dreieck dargestellt.

Die Expression dieser Transkripte werden durch noch unbekannte Mechanismen zell- und gewebespezifisch reguliert [123]. Zum Beispiel sind die dominanten Promotorvarianten des ER α im Endometrium A und C, in Ovarien C und F, in Hoden T, in der Leber E und in Osteoblasten F [118, 124, 125]. Welche Promotorvarianten die Expression von ER α im Herzen initiieren, ist bis dato jedoch nicht bekannt. Über die verschiedenen Promotorvarianten des humanen ER β und deren Regulation ist bislang wenig bekannt. Li *et al.* [126] konnten in verschiedenen humanen Zelllinien

(Prostatakrebs-Zelllinien: PC3, DU145, TSUPr1 und HeLa Zellen) zwei Transkripte von ER β finden, die ebenfalls zelltypspezifisch exprimiert werden.

Um die Funktion von ER in der Physiologie und Pathophysiologie des Herzens zu verstehen, wurden eine große Anzahl von Studien mit genetisch veränderten Mausmodellen (mit der Deletion der ER-Gene: ER-Knockout), und pharmakologischen Ansätzen (unter Anwendung ER-selektiver Agonisten) durchgeführt. Da in der vorliegenden Habilitationsschrift der Fokus auf der Rolle von ER α bzw. der durch ER α -vermittelten Effekte im Herzen liegt, wird im Folgenden nur auf die Rolle von ER α im Herzen eingegangen, und einige wichtige Wirkungen von ER α im Herzen beschrieben.

Humane Studien zeigten, dass eine reduzierte ER α Expression (bedingt durch die Polymorphismen im ER α -Gen oder die Methylierung des Gens) mit einem erhöhten Auftreten atherosklerotischer Plaque bei Männern und Frauen, insbesondere bei prämenopausalen Frauen, einhergeht [111, 127].

In Übereinstimmung mit diesen klinischen Befunden haben Studien mit weiblichen ER α -Knockout Mäusen [128], die einer Ischämie/Reperfusion (I/R) unterworfen waren, im Vergleich zu den WT-Mäusen weniger lebensfähige Kardiomyozyten, eine verminderte Koronarflussrate, ein myokardiales Ödem, eine schwere Schädigung der Mitochondrien und eine verminderte Kontraktilität gezeigt [129, 130]. Im Gegensatz dazu führte eine akute Behandlung mit E2 und ER α -Agonisten PPT (4,4',4''-(4-Propyl-(1H)-pyrazol-1,3,5-Triyl) trisphenol) in einem *in vivo* Kaninchenmodell nach I/R zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße und einer verbesserten Herzfunktion im Vergleich zu den nicht-behandelten Tieren [131]. Eine ähnliche *in vivo*-Studie mit ovariectomierten Ratten [132] sowie eine *in vitro*-Studie an isolierten perfundierten Herzen ovariectomierter Ratten [133] zeigten, dass die akute Substitution von PPT während der Ischämie zu einer Verringerung von Infarktgröße, Neutrophilinfiltration, Oxidationsstress, Nekrose und einer Verbesserung der Herzfunktion führt. Vornehm *et al.* [134] zeigten an isolierten perfundierten männlichen Rattenherzen, dass eine post-ischämische Administration von PPT ebenfalls eine verbesserte Herzfunktion bewirken kann.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass E2 über die Aktivierung des ER α die Entwicklung der Druckbelastungs-induzierten linksventrikulären Hypertrophie in ovariectomierten Weibchen schwächte und die Aktivierung der p38-MAPK, die eine wichtige Rolle bei der Initiierung der kardialen Hypertrophie und bei der Entwicklung von

Herzinsuffizienz spielt, verhinderte [33, 135, 136]. Weiterhin erhöhte eine Aktivierung des ER α in Kardiomyozyten neonataler Ratten die Transkription des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) [137], welches wiederum auf molekularer Ebene über die Regulation von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) Hypertrophie-hemmend wirkt [138].

Zusammengefasst deuten die oben angeführten Studien auf eine wichtige Rolle von E2 und ER α in der Physiologie und Pathophysiologie des Myokards hin. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings sehr komplex und weitestgehend nicht verstanden. Daher sind weitere fundierte Studien unerlässlich, um die E2-abhängigen ER α Wirkungsmechanismen im Herzen aufzudecken.

1.4. Zielstellung

Es ist allgemein anerkannt, dass das Herz ein Zielorgan für E2 und ER α ist. Obwohl viele Tierversuche und Studien an Menschen eine protektive Wirkung von E2/ER α auf das kardiovaskuläre System zeigten, ist deren therapeutische Anwendung bei Herzerkrankungen durch die Tatsache, dass die zugrunde liegenden Mechanismen der Wirkung von E2/ER α nicht vollständig bekannt sind, begrenzt. Daher sind umfassendere Kenntnisse über E2/ER α Wirkmechanismen erforderlich, um ein besseres Verständnis der Wirkungen von E2 und ER α im Herzen zu erlangen, und somit Wege zur selektiven Verbesserung vorteilhafter Wirkungen auf das kardiovaskuläre System aufzuzeichnen. Um das Verständnis über die Regulationsmechanismen von E2/ER α im Herzen zu erweitern, und dabei Hinweise auf deren Bedeutung für die Physiologie und Pathophysiologie des Myokards zu erhalten, sollen daher im Rahmen der hier zusammengefassten Forschungsarbeiten die folgenden grundlagenorientierten Themen bearbeitet werden:

- 1) Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von ER α im humanen linken Ventrikel unter Berücksichtigung möglicher krankheits- und geschlechtsabhängiger Unterschiede.
- 2) Analyse der transkriptionellen Regulation des ER α -Gens im humanen Herzen.
- 3) Identifizierung und Charakterisierung der Interaktionspartner des E2-aktivierten ER α im humanen Herzen, sowie die Analyse der funktionellen Bedeutung dieser Interaktionen für die Vermittlung der genomischen und nicht-genomischen Wirkungen des E2/ER α im humanen Herzen.
- 4) Analyse der molekularen Mechanismen und Funktion des ER α speziell in Kardiomyozyten in einem transgenen Mausmodell unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Erhöhte ER Expression in den Herzen von Patienten mit Aortenstenose

Chronisch hämodynamische Überlastungen, wie bei Aortenklappenstenose (AS), führen zur Myokardhypertrophie und folglich zur Herzinsuffizienz, welche einer der häufigsten Todesursachen in Industrieländern ist. Obwohl humane und tierexperimentelle Untersuchungen darauf hinwiesen, dass Östrogenrezeptoren (ER) in der Entwicklung kardialer Hypertrophie involviert sind [18, 19, 33, 137, 139-141], wurden bis dato die ER-Expression im menschlichen Herzen und ihre Beziehung zur Hypertrophie-bedingten Genexpression nicht analysiert. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit geschlechts- und krankheitsabhängige Veränderungen der ER-Expression in den Herzen von Patienten mit AS, und deren Korrelation mit der Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene untersucht. Hierfür wurden linksventrikuläre Biopsien von weiblichen und männlichen Patienten mit AS (n=14) und Kontrollherzen mit normaler systolischer Funktion (n=17) verwendet. Mit Hilfe der quantitativen PCR und Westernblot Analyse konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression von ER krankheitsabhängig reguliert wird. Im AS Herzen war im Vergleich zu den Kontrollherzen die Expression von ER α sowohl auf mRNA (2,6-fache) als auch auf Proteinebene (1,7-fache) signifikant erhöht. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen mit anschließender konfokaler Laserscanmikroskopie konnte erstmalig ER α im humanen linksventrikulären Myokard im Zytoplasma (an den Sarkomeren) und in den Kernen der Kardiomyozyten detektiert werden. Obwohl die mRNA Expression von Hypertrophie-markern, wie Calcineurin A- β , ANP (atriales natriuretisches Peptid) und BNP (B-type natriuretisches Peptid), in den Herzen von AS Patienten signifikant erhöht war, konnte keine Korrelation zwischen ER α Expression und diesen Hypertrophie-markern gefunden werden. Die linksventrikuläre ER β mRNA war in Patienten mit AS um das 2,6-fache erhöht, wobei der prozentuale Anstieg der ER β mRNA bei weiblichen Patienten stärker ausgeprägt war als bei männlichen Patienten. ER β wurde ebenfalls im Zytoplasma (an den Sarkomeren) und in den Kernen der Kardiomyozyten detektiert. Zusätzlich fanden wir bei den Patienten mit AS eine inverse Korrelation zwischen ER β mRNA und Calcineurin A- β . Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die humane kardiale Expression von ER α und ER β durch Myokarddrucküberladung, also krankheitsabhängig, reguliert

werden, und somit Hinweise auf die Relevanz und funktionelle Rolle dieser Rezeptoren in der Pathogenese der Herzerkrankungen liefern.

Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. Nordmeyer J*, Eder S*, **Mahmoodzadeh S**, Martus P, Fielitz J, Bass J, Bethke N, Zurbrügg HR, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. *Circulation*. 2004;110(20):3270-5.
<http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000147610.41984.E8> [142].

2.2. Krankheitsabhängige Regulation kardialer Expression und Lokalisation des ER α bei Patienten mit Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist mit Veränderungen der Myokard-Architektur verbunden, die zu einer Herzdysfunktion und letztendlich zum Tod führen können. Tierexperimentelle Studien sowie unsere eigenen Arbeiten deuten darauf hin, dass ER an dem myokardialen Remodelling in der Herzhypertrophie beteiligt sind [106, 137, 142]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit, ob die Expression, Lokalisation sowie die Assoziation des humanen myokardialen ER α mit den Strukturproteinen im Falle einer menschlichen Herzinsuffizienz (bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie: DCM; n=41) im Vergleich zu Kontrollherzen mit normaler systolischer Funktion (n=25) verändert ist. Quantitative PCR und Westernblot Analysen zeigten, dass die ER α Expression in den Herzen weiblicher und männlicher Patienten mit DCM um das 1,8-fache, gegenüber den Kontrollherzen, erhöht war. In den Kontroll- und in DCM Herzen konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Laserscanmikroskopie das ER α -Signal in den Kernen von Kardiomyozyten, Fibroblasten, vaskulären glatten Muskel- und Endothelzellen, sowie nahe dem Sarkolemma und im Zytoplasma an den Sarkomeren der Kardiomyozyten lokalisiert werden. Während an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten in den gesunden Herzen ein starkes ER α Signal beobachtet werden konnte, fehlte dieses ER α Signal weitgehend an den Glanzstreifen in den DCM Herzen. Die Ko-Lokalisationsexperimente von ER α mit einigen Strukturproteinen zeigten, dass in den Kardiomyozyten gesunder Herzen eine Assoziation zwischen ER α mit β -Catenin und Vinculin, aber nicht mit TroponinT, Cx43 (Connexin 43) und Vimentin besteht. Immunpräzipitationsstudien bestätigten, dass ER α und β -Catenin miteinander interagieren und im gesunden Herzen in einem Proteinkomplex vorliegen. In den erkrankten Herzen jedoch konnte aufgrund des Fehlens des ER α -Signals an den Glanzstreifen fast keine ER α und β -Catenin Ko-Lokalisation beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Interaktion von ER α und β -Catenin an den Glanzstreifen von funktioneller Bedeutung ist und ein Verlust dieser Assoziation eine Rolle beim Fortschreiten der Herzinsuffizienz spielen könnte. Somit könnte die erhöhte Expression von ER α in den DCM Herzen einen kompensatorischen Prozess darstellen.

Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure (2006).
Shokoufeh Mahmoodzadeh*, Sarah Eder*, Johannes Nordmeyer*, Elisabeth Ehler,
Otmar Huber, Peter Martus, Jörg Weiske, Reinhard Pregla, Roland Hetzer, and Vera
Regitz-Zagrosek.

<http://dx.doi.org/10.1096/fj.05-5148com> [143].

(* geteilte Autorschaft)

2.3. Wechselseitige Regulation der ER α Transkription durch NF- κ B und E2-Signalwege im humanen Herzen

Unsere eigenen Arbeiten mit humanen linksventrikulären Biopsien von Patienten mit AS und DCM zeigten, dass die Expression von ER α krankheitsabhängig reguliert wird [142, 143], allerdings waren bis dato die Mechanismen, die an der Regulation der Expression des ER α Gens selbst im humanen Herzen beteiligt sind, unklar. Bislang sind für das humane ER α Gen 7 verschiedene Promotorvarianten mit jeweils eigener 5'-UTR (A, B, C, D, E, F und T) identifiziert, welche zell- und gewebetypabhängig die Transkription des humanen ER α Gens regulieren [120]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir als erstes, welche dieser 5'-UTR Transkriptvarianten des ER α Gens im menschlichen Herzen vorhanden sind. Anschließend analysierten wir die molekularen Mechanismen, die bei der Regulation der am häufigsten vorkommenden Promotorvariante beteiligt sind. Mittels 5'-RACE PCR (*Rapid Amplification of cDNA-Ends with polymerase chain reaction*), PCR und semiquantitativer PCR konnte gezeigt werden, dass die 5'-UTR-Varianten A, B, C und F im menschlichen Herzen exprimiert werden, wovon der F-Promotor die dominante Variante ist. Mit Hilfe des Luziferase-Reporter Assays, der *site-directed-mutagenesis* und der EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)/Supershift konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B (p50 Untereinheit) an dem F-Promotor, zwischen -483bp und -448bp, bindet und somit die basale F-Promotor-Aktivität des humanen ER α Gens in AC16 Zellen (eine humane ventrikuläre Kardiomyozyten-Zelllinie) massiv unterdrückt. Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Parthenolid, ein NF- κ B Inhibitor, hingegen führte zu einer signifikanten Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des F-Promotors in AC16 Zellen. Parthenolid verhinderte die Aktivierung und somit die Translokation von NF- κ B in den Kernen der Kardiomyozyten. Im Gegensatz dazu führte die Erhöhung der NF- κ B-Expression durch den Einsatz von Tumornekrosefaktor- α (TNF α) zu einer Verringerung der Expression von ER α , was nochmals bestätigte, dass der NF- κ B Signalweg die Expression von ER α in humanen Kardiomyozyten hemmt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass E2 die transkriptionellen Aktivitäten aller identifizierten kardialen humanen ER α -Promotorvarianten nur in Anwesenheit von ER α in Kardiomyozyten signifikant erhöht (Autoregulation). Somit wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass im menschlichen Herzen die Inflammationsstimuli über die Aktivierung des NF- κ B die ER α -Expression

über den F-Promotor unterdrücken, und E2 über ER α die hemmende Wirkung von NF- κ B durch erhöhte Aktivierung der ER α -Promotoren im menschlichen Myokard antagonisieren kann.

Nuclear factor-kappaB regulates estrogen receptor-alpha transcription in the human heart. **Mahmoodzadeh S***, Fritschka S*, Dworatzek E, Pham TH, Becher E, Kuehne A, Davidson MM, Regitz-Zagrosek V. J Biol Chem. 2009; 284(37):24705-14.

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.000463> [144].

2.4. 17 β -Östradiol-induzierte Interaktion des ER α mit NPPA reguliert die Genexpression der E2-Zielgene im humanen Herzen

Für eine akkurate und effiziente Vermittlung genomischer E2-Effekte, benötigen die ER die Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen, die so genannten Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren [145-147]. Bis dato waren nur wenige Ko-Regulatoren im menschlichen Herzen beschrieben. Von daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit neue Protein-Interaktionspartner zu identifizieren, die mit ER α im humanen Herzen interagieren und somit die E2-abhängige ER α -Aktivität regulieren. Mit Hilfe des „*Yeast-Two-Hybrid*“-Systems (Y2H) und unterschiedlichen Domänen des ER α (Full-length, AB-, AD- und EF-Domäne) als Köderprotein wurde eine cDNA Bibliothek des humanen Herzes nach neuen Interaktionspartnern durchsucht. Von den dabei identifizierten Proteinen wurde das NPPA Protein, der Präkursor des atrialen natriuretischen Peptids A (ANP, ein bekannter Hypertrophiemarker [148]), ausgewählt, welches als ein neuartiger ER α -Interaktionspartner im humanen Herzen nur in Anwesenheit von E2 mit ER α Full-length sowie mit ER α -EF Domain interagiert. Funktionelle Analysen mit Hilfe der Luziferase-Reporter-Assay mit verschiedenen NPPA-Promotorsequenzen in AC16 Zellen zeigten, dass mit E2-aktiviertem ER α die Transkription von NPPA in Kardiomyozyten hochreguliert wird. Eine E2-induzierte Interaktion von NPPA mit ER α führte jedoch zu einer Inhibierung der transkriptionellen Aktivität des ER α , und supprimierte somit die Hochregulation des NPPA-Gens. Damit wurde mit NPPA ein selektiver Ko-Repressor des ER α im humanen Herzen identifiziert. Weitere Mutationsanalysen und Immunfluoreszenzdaten zeigten, dass das LXXLL-Motiv innerhalb des NPPA-Proteins, welches ein bekanntes Motiv innerhalb der Ko-Regulatoren der ER ist [98, 149], für die Interaktion von NPPA mit ER α , für die Translokation von NPPA in die Zellkerne von Humanen- und Ratten-Kardiomyozyten, sowie für die Wirkung von NPPA als Repressor der ER α -Aktivität, notwendig ist. Darüber hinaus wurde eine ERE-Bindungsstelle für ER α innerhalb des NPPA-Promotors identifiziert, welches für die E2-induzierte Transkription des NPPA-Gens wichtig ist. In Anwesenheit von NPPA konnte jedoch ER α nicht mehr an den NPPA-Promotor binden. Interessanterweise haben weitere Analysen gezeigt, dass die E2-induzierte NPPA/ER α Interaktion auch die Expression einiger anderer E2-Zielgene regulierte, die bei der Entwicklung der Herzhypertrophie/Herzinsuffizienz eine Rolle spielen, wie z.B. Cx43,

Alpha-Aktinin-2, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*), COL1A1 (Kollagen-Type I, alpha 1) und COL3A1 (Kollagen-Type III, Alpha 1). Somit liefern diese Daten starke Indizien dafür, dass E2 und ER α mit Mechanismen, welche die physiologischen und die pathophysiologischen Prozesse in Kardiomyozyten regulieren, interferieren. In dieser Hinsicht könnte NPPA ein therapeutisches Zielmolekül darstellen, welches selektiv die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen reguliert.

17 β -Estradiol-induced interaction of ER α with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes. **Mahmoodzadeh S**, Pham TH, Kuehne A, Fielitz B, Dworatzek E, Kararigas G, Petrov G, Davidson MM, Regitz-Zagrosek V. *Cardiovasc Res.* 2012; 96(3):411-21.

<http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvs281> [150].

2.5. 17 β -Östradiol-induzierte Interaktion des ER α mit ALC-1 reguliert die genomischen und nicht-genomischen ER α -Wirkungen im Herzen

Obwohl das ALC-1 Protein (atriale essentielle leichte Myosinkette) aufgrund seiner positiv inotropen Wirkweise als ein wichtiges Protein für die Regulation kardialer Kontraktilität erachtet wird [151-153], war bis dato wenig über die Regulation seiner Expression bekannt. Vor dem Hintergrund, dass E2 bei der Regulation der kontraktilen Funktion im Herzen eine Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss von E2 und ER α auf die Regulation der ALC-1 Expression im humanen Herzen untersucht, und anschließend die funktionelle Bedeutung E2-induzierter Regulation von ALC-1 analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass E2 die Expression von ALC-1 im menschlichen atrialen Gewebe beider Geschlechter und in AC16-Zellen herunter reguliert. E2-aktivierter ER α bindet an das ERE-Motiv innerhalb des humanen ALC-1 Promotors und reduzierte seine transkriptionelle Aktivität. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass nach einer E2-Aktivierung ER α und ALC-1 zusammen in die Zellkerne von AC16 Zellen transportiert werden, was auf eine ko-regulatorische Funktion des humanen ALC-1 hindeutet. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass humanes ALC-1 den inhibitorischen Effekt von E2/ER α verstärkt. Damit wurde eine neue Funktion für das humane ALC-1 Protein, nämlich als ein Ko-Repressor von E2-aktiviertem ER α für seinen eigenen Promotor und für einige andere E2-Zielpromotoren (mit funktionellem ERE), nachgewiesen. Unterstützend dazu konnte mittels Y2H gezeigt werden, dass ER α und ALC-1 nur in Anwesenheit von E2 miteinander interagieren, und dadurch die Expression der Zielgene zusammen regulieren. Als weitere neuartige Wirkung konnten wir zeigen, dass E2 in adulten Maus-Kardiomyozyten der humanen ALC-1-vermittelten Verbesserung der kontraktilen Funktion entgegen wirkte, und die Verkürzungsamplitude der Kardiomyozyten signifikant reduzierte und die Verkürzungs- und Relaxations-Geschwindigkeiten abschwächte. Dies könnte für die Kompensationsprozesse in den überbelasteten Herzen und die Erhaltung der Herzfunktion von Bedeutung sein.

17 β -Estradiol-induced interaction of estrogen receptor α and human atrial essential myosin light chain modulates cardiac contractile function. Duft K, Schanz M, Pham H, Abdelwahab A, Schriever C, Kararigas G, Dworatzek E, Davidson MM, Regitz-Zagrosek

V, Morano I, **Mahmoodzadeh S**. Basic Res Cardiol. 2017 Jan;112[154]:1. Epub 2016 Nov 11.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00395-016-0590-1> [155].

2.6. Überexpression von ER α in weiblichen murinen Kardiomyozyten erhöht die Angiogenese und Lymphangiogenese und reduziert die kardiale Fibrose nach einem Myokardinfarkt

Verschiedene Studien demonstrierten, dass der aktivierte ER α in der Pathogenese der Herzerkrankungen, wie Myokardinfarkt, eine wichtige Rolle spielen [129-131, 133]. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht im Detail verstanden. Um die spezifische Rolle von ER α in Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein neues transgenes Mausmodell mit einer Kardiomyozyten-spezifischen ER α -Überexpression (ER α -OE) generiert. Im Vergleich zu den WT-Mäusen zeigten die weiblichen und männlichen ER α -OE Mäuse eine signifikant erhöhte ER α -Proteinexpression (10- bis 12-fach) und ER α -Phosphorylierung (3- bis 5-fach) in den linken Ventrikeln, wobei ER α hauptsächlich in den Kernen der Kardiomyozyten lokalisiert war. Die ER α -OE Mäuse entwickelten unter basalen Bedingungen eine kardiale Hypertrophie, die mit einer höheren linksventrikulären Masse, erhöhten linksventrikulären Volumina, einer größeren Kardiomyozytenlänge und verstärkter Expression von Hypertrophie-Markern assoziiert war. Die ER α -OE Mäuse zeigten keine erhöhte Kollagenablagerung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zwei Wochen nach der Induktion eines Myokardinfarktes zeigten nur die weiblichen ER α -OE Mäuse keine signifikante Zunahme der linksventrikulären Volumina und keine signifikant reduzierte linksventrikuläre Wanddicke im Vergleich zu den weiblichen und männlichen WT und männlichen ER α -OE Mäuse. Ebenfalls wurde nur in den weiblichen ER α -OE Mäusen Post-Infarkt eine signifikant geringere Induktion von Fibrose-assoziierten Genen (COL1A1, COL3A1) und Kollagenablagerung im Herzen beobachtet. Allerdings führte in beiden Geschlechtern die ER α -OE zu einer erhöhten Expression von Angiogenese- und Lymphangiogenese Markern (VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), LYVE-1 (*Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor 1*), sowie einer erhöhten Neovaskularisierung im Peri-Infarktbereich. Zusammenfassend konnte diese Studie zeigen, dass ER α als Antwort auf kardiale Ischämie speziell in weiblichen Kardiomyozyten durch die Verbesserung der vaskulären Struktur und Funktion und eine Reduktion kardialer Fibrose kardioprotektiv wirkt.

Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-myocardial Infarction. **Shokoufeh Mahmoodzadeh**, Joachim Leber, Xiang Zhang, Frédéric Jaisser, Smail Messaoudi, Ingo Morano, Priscilla A Furth, Elke Dworatzek and Vera Regitz-Zagrosek. J Cell Sci Ther 5: 153.

<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7013.1000153> [156].

3. Diskussion

Zahlreiche Studien weisen auf eine protektive Wirkung von E2 und ER α auf das kardiovaskuläre System hin, die zugrundeliegenden Steuerungsmechanismen des E2/ER α Signalweges im menschlichen Herzen sind allerdings im Detail nicht verstanden. Ein umfassendes Verständnis der Funktion von E2/ER α im Herzen bedarf noch weiterer Forschung. Dies könnte dazu beitragen, einerseits die E2-vermittelten Wirkungen besser aufzuklären, und andererseits die molekularen Mechanismen geschlechtsspezifischer Unterschiede bei Herzerkrankungen zu verstehen. Mit diesem Wissen könnten neue Diagnose- und Therapieansätze von Herzerkrankungen ermöglicht werden.

3.1. Expression, Lokalisation und krankheitsabhängige Regulation von ER α im humanen Herzen

Für die Analyse der ER-Funktionen im Herzen ist eingehende Kenntnisse der Expression und Lokalisation des ER im Herzen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen erforderlich. Die Expression und Lokalisation myokardialer ER wurden bis dato hauptsächlich in Mäuse- und Rattenherzen untersucht [106, 107]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass ER α im humanen Herzen exprimiert und funktionell aktiv ist. Es konnten gezeigt werden, dass die Expression von ER α sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in den linksventrikulären Myokardgeweben weiblicher und männlicher Patienten mit AS und DCM gegenüber Kontrollherzen signifikant hochreguliert war. (Manuskript 2.1 und 2.2: [142, 143]). Vergleichbare Ergebnisse ließen sich später in ähnlichem Maße auch für eine erhöhte ER α Expression in den Herzen von Patienten mit koronarer Herzerkrankung nachweisen [157]. Diese krankheitsabhängige ER α Expression weist auf eine physiologische Funktion dieses Rezeptors im humanen Herzen hin, und könnte einen Kompensationsmechanismus des ER α widerspiegeln, um einer Verschlechterung der ventrikulären Funktion bei diesen Herzerkrankungen entgegenzuwirken. Diese Annahme wird durch tierexperimentelle Untersuchungen unterstützt, welche gezeigt haben, dass eine Deletion des ER α Gens [128] mit schweren Herzschäden und schlechterer Herzfunktion nach I/R-Verletzungen assoziiert ist [129, 130], während bei

einer Behandlung mit einem spezifischen ER α -Agonisten die normale Herzfunktion nach I/R wiederhergestellt werden kann [131-134].

Die Analyse der subzellulären Lokalisationen von ER α in menschlichen Herzen lieferte weitere Hinweise für die physiologische Rolle des ER α im Herzen. In Übereinstimmung mit der bereits bekannten Rolle von ER α als Liganden-induzierbarer Transkriptionsfaktor, der im Zellkern die Expression der Zielgene reguliert, wurde in unseren Studien das ER α Signal immunhistologisch in den meisten Kernen von Kardiomyozyten, Fibroblasten, vaskulären glatten Muskel- und Endothelzellen von gesunden sowie erkrankten Herzen lokalisiert (Manuskript 2.1 und 2.2: [142, 143]). Diese Befunde waren in Übereinstimmung mit anderen Studien, die ebenfalls eine nukleare Lokalisation von ER α in den Mäuse- und Rattenherzen zeigten [106, 109, 158]. Grohe *et al.* [106] und Nuedling *et al.* [158] [154] haben eine nukleäre Translokation von ER α in den Kernen von Rattenkardiomyozyten und –Fibroblasten nach einer Stimulation mit E2 nachgewiesen, was auf eine funktionelle Rolle dieses Rezeptors als Transkriptionsfaktor (genomische Wirkung von ER α) hindeutet. Tatsächlich zeigten unsere Studien und die von den anderen, dass ER α als Transkriptionsfaktor in humanen und Rattenkardiomyozyten und Fibroblasten nach einer E2-Stimulation aktiv die Transkription verschiedener E2-Zielgene, wie z.B. Cx43, NPPA, COL1A1, COL3A1, NFAT, α -MHC (α -Myosin schwere-Kette), MMP2 (Matrix-Metalloproteinase-2), ALC-1, Ca²⁺ L-Type Kanal und ER α selbst regulieren kann (Manuskript 2.3 [144], 2.4 [150], 2.5 [155], 2.6 [156], und [88, 106, 137]).

ER α kann, zusätzlich zu seiner Rolle als Transkriptionsfaktor in den Zellkernen, mit verschiedenen zytoplasmatischen Proteinen interagieren [159, 160]. Wir fanden in den Kardiomyozyten von gesunden sowie von erkrankten Herzen (AS und DCM) ein regelmäßig alternierendes Muster von ER α und Troponin T Signalen an den Sarkomeren (Manuskript 2.1 und 2.2: [142, 143]), wie dieses in den Rattenkardiomyozyten beobachtet wurde [109, 158]. Da das ER α Signal in den Kardiomyozyten in der Nähe von Troponin T detektiert war, aber mit diesem nicht ko-lokalisierte, nahmen wir eine Ko-Lokalisation vom ER α mit den Proteinen des myofibrilären Apparates an. Während keine ER α Ko-Lokalisation mit der MyHC-Isoform (Myosin schwere-Kette) detektiert werden konnte, wurde interessanterweise eine Ko-Lokalisation von ER α mit humanem ALC-1 beobachtet (Manuskript 5: [155]), was u.a.

auf eine funktionelle Rolle von ER α in der Regulation der Kontraktilität in den Kardiomyozyten hindeutete (siehe dazu auch den Punkt 3.2.2).

Mittels einer Doppel-Immunfärbung mit Vinculin, ein sarkolemmaler Membranmarker, konnte in dieser Arbeit erstmals die Lokalisation von ER α an der Plasmamembran humaner Kardiomyozyten gezeigt werden, wo ER α mit Vinculin ko-lokalisiert (Manuskript 2.2: [143]). Es ist bislang nicht klar, ob ER α in der Plasmamembran der Kardiomyozyten integriert ist oder damit lediglich assoziiert ist. Da der ER α aber keine transmembranäre Domäne besitzt, scheint es unwahrscheinlich, dass dieser Rezeptor in der Membran lokalisiert ist. Von daher ist eine enge Assoziation vom ER α mit anderen Proteinkomplexen an der Membran eher plausibel. Kandidaten dafür könnten z.B. Shc, c-Src, IGF-1-Rezeptor, Caveolin und PI3-Kinase sein [89, 161-163]. Oberflächenmarkierungsexperimente mit einem Membran-nicht-permeablen fluoreszenzmarkierten E2 (E2-BSA-FITC) lieferten weitere Hinweise auf das Vorhandensein membranassoziierter ER α in Kardiomyozyten, welcher eine kritische Rolle bei der Vermittlung der schnellen, nicht-genomischen Effekte von E2 spielen [164, 165].

Interessanterweise zeigten unsere Immunfluoreszenz-Analysen, dass im Gegensatz zu den gesunden Herzen das ER α -Signal an den meisten Glanzstreifen der Herzgewebe von Patienten mit AS und DCM fehlte (Manuskript 2.2: [143]). Diese krankheitsabhängige Lokalisationsveränderung des ER α an den Glanzstreifen deutet nochmals auf eine funktionelle Rolle des ER α in den humanen Herzen hin. Aufgrund der Tatsache, dass die Glanzstreifen die benachbarten Kardiomyozyten fest miteinander verbinden und somit eine wichtige Rolle bei der Integrität und Stabilität der Kardiomyozyten spielen, jedoch unter pathologischen Bedingungen, wie Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz, erhebliche strukturelle und funktionelle Veränderungen aufweisen [166], war es von Bedeutung zu untersuchen, ob ER α bei diesen Prozessen eine Rolle spielt. Innerhalb der Glanzstreifen befinden sich Gap junctions, Adherens junctions und Desmosomen. Über die Gap junctions sind die Kardiomyozyten elektrisch gekoppelt. Adhaerens junctions und Desmosomen verleihen dem Kardiomyozytenverband Stabilität und ermöglichen eine Kraftübertragung zwischen den Zellen.

Cx43 ist der Hauptbestandteil von Gap junctions. An den Glanzstreifen im gesunden Herzen liegt Cx43 überwiegend in phosphorylierter Form vor [167]. Cx43 ist bei ischämischen Ereignissen hingegen dephosphoryliert und wird von den Gap junctions ins Zytoplasma oder an die Plasmamembran der Kardiomyozyten transloziert [168-170]. Dieses Phänomen konnte auch in den Kardiomyozyten unserer DCM Herzen beobachtet werden (Manuskript 2.2: [143]). Chung *et al.* [165] berichteten, dass Cx43 in den Rattenkardiomyozyten über den E2-aktivierten ER α phosphoryliert werden kann. Es wäre auch in gesunden humanen Herzen denkbar, dass ER α die Phosphorylierung des Cx43 und somit die Lokalisation an den Gap junctions begünstigt. Diese Annahme wurde auch durch die Tatsache gestützt, dass in den Herzen von Patienten mit DCM die Signale für ER α und Cx43 an den Gap junctions fehlten. Das Fehlen des ER α an den Gap junctions könnte eine Erklärung für geringere Phosphorylierung von Cx43 und somit dessen Translokation weg von den Gap junctions sein. Die Tatsache, dass in unserer Studie keine Ko-Lokalisation von ER α und Cx43 in den humanen Herzproben nachgewiesen werden konnte, schließt eine solche Wechselwirkung jedoch nicht aus. Denn es könnte sein, dass diese Effekte im Komplex mit anderen Proteinen stattfinden. So ein Proteinkomplex konnte z.B. beim β -Catenin, α -Catenin, ZO-1 (Zonula Occludens-1) und Cx43 Komplex beschrieben werden, dessen Zusammensetzung für die Bildung von Gap junctions notwendig ist, wie dies in den Kardiomyozyten von Ratten gezeigt wurde [171].

β -Catenin gehört zu den sogenannten Adherens junctions innerhalb der Glanzstreifen von Kardiomyozyten und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion sowie bei der intrazellulären Signalübertragung [172, 173]. In den gesunden Herzen fanden wir immunhistologisch eine Ko-Lokalisation von ER α mit β -Catenin an Glanzstreifen der Kardiomyozyten, und konnten mittels der Co-Immunopräzipitation auch deren Interaktion nachweisen. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit anderen Studien, welche ebenfalls eine Interaktion von ER α mit β -Catenin in anderen Zelltypen gezeigt haben [172, 174]. Bedingt durch das Fehlen des ER α Signals an Glanzstreifen der Herzen von Patienten mit AS und DCM, war diese Ko-Lokalisation in den erkrankten Herzen nicht mehr nachweisbar (Manuskript 2.2: [143]). Daher ist es denkbar, dass in den menschlichen Kardiomyozyten einen

Multiproteinkomplex mit ER α , β -Catenin und Cx43 existiert, der die Struktur/Funktion der Gap Junctions und Adherens junctions an den Glanzstreifen regulieren kann.

Um die zelltypspezifischen Expression und die vielfältigen funktionelle Rollen von ER α besser zu verstehen, ist die detaillierte Charakterisierung des ER α -Promotors von großer Bedeutung. Es sind bislang 7 verschiedene Promotorvarianten des humanen ER α (A, B, C, D, E, F und T) identifiziert worden, die über Interaktionen mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren [175-179] die Expression des ER α zell- und gewebespezifisch regulieren können [180, 181]. Wir konnten zeigen, dass in den humanen linksventrikulären Herzproben, die von Spenderherzen stammten, die ER α -mRNA von vier verschiedenen 5'-UTR-Varianten des ER α -Gens und deren assoziierten Promotoren A, B, C und F transkribiert werden, wobei das F-Transkript und damit der distale F-Promotor (ca. -117140 bp stromaufwärts vor dem Transkriptionsstartpunkt +1) die dominante Form darstellt (Manuskript 2.3, [144]). Einige Studien haben gezeigt, dass dieser F-Promotor auch die Expression der ER α -mRNA in den humanen Knochen und primären Osteoblasten reguliert [125, 182, 183]. Die Verwendung verschiedener ER α -Promotorvarianten wird als ein Kontrollmechanismus betrachtet, welcher zu einer gewebespezifisch koordinierten bzw. kontrollierten ER α -Genexpression unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen beiträgt [123, 184]. Ferner weisen unsere Befunde darauf hin, dass inflammatorische Stimuli über die Aktivierung von NF- κ B auf die transkriptionelle Aktivität des ER α F-Promotors im Herzen supprimierend wirken und damit die Expression von ER α reduzieren. Dies könnte der Grund dafür sein, dass bei postmenopausalen Frauen mit einer bereits bestehenden Arteriosklerose und einer erhöhten NF- κ B-Aktivität die Expression von ER α stark reduziert ist und deshalb eine E2-Substitution nicht kardioprotektiv wirkt und der Verlauf der Arteriosklerose nicht beeinflusst werden kann [185, 186]. Eine erhöhte Aktivierung von NF- κ B wurde ebenfalls bei mehreren Herzerkrankungen, u. a. kardialer Hypertrophie, Myokardinfarkt, Myokarditis und kardialem Remodelling beschrieben, wohingegen die Blockierung des NF- κ B-Signalwegs den Patienten eine Verbesserung der Herzfunktion und erhöhte Überlebenschancen brachte [187-190].

Es wurde berichtet, dass E2 über ER α die Aktivierung von NF- κ B durch verschiedene Mechanismen inhibieren kann, wie z.B. durch 1) direkte ER α -NF- κ B Interaktion [191], 2)

Erhöhung der I κ B Synthese [192], 3) Verhinderung der NF- κ B-Bindung an die DNA [193, 194] und 4) Konkurrenz um gemeinsame Ko-Aktivatoren [195, 196]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir, ob E2 die Aktivität verschiedener ER α -Promotorvarianten beeinflussen kann. Unsere Untersuchungen in AC16 Zellen ergaben, dass nach einer Behandlung mit E2 alle humanen ER α -Promotorvarianten A, B, C, und F nur in Anwesenheit von ER α eine erhöhte Promotoraktivität zeigten. Es kann, in Übereinstimmung mit anderen Studien [180, 182, 197], geschlossen werden, dass ER α seine eigene Expression steigern kann (positiver *Feedback Loop*). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht vollständig erforscht. Da aber alle diese Promotorvarianten einige halbpalindromische ERE-Motive besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Bindung von E2-aktiviertem ER α an diese Motive innerhalb der ER α -Promotorvarianten die transkriptionelle Aktivität dieser Promotoren erhöht wird. Zusammenfassend zeigten wir, dass die inflammatorischen Stimuli die ER α -Expression durch die Aktivierung und die anschließende Bindung von NF- κ B an den ER α F-Promotor im humanen Herzen verringern, und E2/ER α die inhibitorische Wirkung von NF- κ B antagonisieren können. Diese Befunde demonstrieren eine Wechselwirkung zwischen E2/ER α und den kardialen pro-hypertrophen und entzündlichen Reaktionen über NF- κ B.

3.2. Identifizierung und funktionelle Analyse neuer Ko-Regulatoren von ER α im humanen Herzen

Um die genomischen und nicht-genomischen Effekte von E2 effizient zu vermitteln, benötigen die ER die Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen in der Zelle. Daher haben Ko-Regulatoren einen großen Einfluss auf die E2/ER Signalwege. Die für eine effiziente E2/ER-Regulation notwendigen Ko-Regulatoren und die damit verbundenen Regulationsmechanismen im humanen Herzen sind bislang weitestgehend unbekannt. Die Identifizierung neuer Interaktionspartner und die Charakterisierung ihrer Aktivitäten führen zu neuen Erkenntnissen über molekulare Mechanismen von E2 und ER im humanen Herzen. Eingriffe in diese Mechanismen könnten sehr spezifische therapeutische Ansätze ermöglichen.

Auf der Suche nach funktionellen Protein-Interaktionspartnern von ER α im humanen Herzen konnten unter anderem NPPA und ALC-1, als neue E2-abhängige Protein-

Interaktionspartner des humanen ER α identifiziert werden (Manuskript 2.4 und 2.5: [150, 155]). Die funktionelle Analyse der Interaktionen von ER α mit diesen Proteinen ist von großer Bedeutung, da bekannt ist, dass sowohl NPPA wie auch ALC-1 an den physiologischen und pathologischen Prozessen im Herzen beteiligt sind.

3.2.1 Funktionelle Bedeutung der Interaktion von ER α und NPPA im humanen Herzen

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist ein körpereigenes Peptid, welches die Diurese und Natriurese, die periphere Vasodilatation und die Hemmung der Renin- und Aldosteron-Sekretion fördert und darüber hinaus antihypertrophe und antifibrotische Wirkungen besitzt [148, 198, 199]. In gesunden adulten Herzen ist die Expression des NPPA-Gens überwiegend auf die Atrien begrenzt. In fetalen und neonatalen Ventrikeln ist das NPPA-Gen hoch exprimiert, postnatal sinkt jedoch die NPPA-Expression auf ein sehr niedriges Niveau, auf unter 1 % des atrialen Levels, ab [199, 200]. Bei gering ausgeprägter Myokardhypertrophie steigt die NPPA Expression und Sekretion im Atrium, bei fortschreitender linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz findet sich zusätzlich eine NPPA Expression und Sekretion im linken Ventrikel [199, 201]. Der NPPA/ANP-Spiegel im Serum gilt als Marker für den Schweregrad einer Herzerkrankung mit linksventrikulärer Dysfunktion. Eine vermehrte Expression und Sekretion von NPPA/ANP wird allgemein als kardioprotektiver Mechanismus erachtet, welcher die Volumenbelastung im Herzen reduziert.

Viele Studien deuten bereits darauf hin, dass E2/ER die Expression von NPPA im Herzen beeinflusst. Mäuse mit einer Deletion des NPPA-Rezeptor (NPR-A)-Gens zeigten eine starke kardiale Hypertrophie [202, 203], wobei die Herzhypertrophie bei den männlichen Knock-out Mäusen wesentlich größer war als bei den weiblichen, was auf eine Prävention der Herzhypertrophie durch E2 und NPPA bei weiblichen Tieren schließen ließ. Ovariectomie reduzierte in diesem Modell den atrialen NPPA mRNA-Level in weiblichen Ratten und führte zur Zunahme kardialer Hypertrophie. Eine E2-Substitution revidierte diese Veränderungen [204]. Darüber hinaus wurde in einem anderen Hypertrophie-Modell (TAC) gezeigt, dass ovariectomierte Mäuse eine stärkere linksventrikuläre Hypertrophie entwickelten als ovariectomierte mit E2-Substitution [33]. Interessanterweise wurde in der letzteren Gruppe eine erhöhte ventrikuläre NPPA-

Expression beobachtet. Darüber hinaus reduziert E2/ER α die Phenylephrin- und Endothelin1-induzierte Hypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten und stimuliert die NPPA-Expression [137]. ICI 182 780, ein ER-Antagonist, blockiert beide Effekte. Damit konnte gezeigt werden, dass die E2/ER α -vermittelte Induktion von ANP maßgeblich an den Hypertrophie-hemmenden Effekten beteiligt ist. Bis dato blieb jedoch ungeklärt, wie E2/ER α die Expression von NPPA reguliert. Wir konnten zeigen, dass der E2-aktivierte ER α durch direkte Bindung an das ERE-Motiv innerhalb des NPPA-Promotors die Expression von NPPA in den Kardiomyozyten erhöht.

Darüber hinaus konnte NPPA als ein neuer Interaktionspartner von ER α im humanen Herzen identifiziert werden, der nur in Anwesenheit von E2 mit ER α interagiert. NPPA bindet über sein LXXLL-Motiv, welches ein bekanntes Motiv innerhalb der Ko-Regulatoren von ER ist, an den E2-aktivierten ER α , was sich als eine Voraussetzung für die nukleäre Translokation von NPPA in die Zellkerne der Kardiomyozyten darstellte, wo er als Ko-Repressor die transkriptionelle Aktivität des E2-aktivierten ER α inhibiert. Die Interaktion von ER α mit seinem Ko-Repressor NPPA moduliert in den Kardiomyozyten die genomische Wirkung von E2 auf mehrere E2-responsiven Gene, wie NPPA, Cx43, COL1A1, COL3A1 und NFAT, die bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie und Fibrose eine immanente Rolle spielen, und folglich reguliert das Ausmaß der transkriptionellen Antwort auf unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Bedingungen. Somit wird deutlich, dass die Analyse dieser Interaktion von großer Bedeutung ist, denn die E2-induzierte ER α -NPPA Interaktion stellt bis dahin einen unbekanntenen Mechanismus für die Regulation kardiovaskulärer Erkrankungen dar.

3.2.2. Funktionelle Bedeutung der Interaktion von ER α und ALC-1 im Herzen

Als ein weiterer neuartiger kardialer Interaktionspartner von ER α identifizierten wir humanes ALC-1, das nur in Anwesenheit von E2 mit ER α interagiert. ALC-1 spielt bei der Regulation der mechanischen Funktion des kontraktiven Apparates der Kardiomyozyten eine wichtige Rolle. Die Bedeutung von ALC-1 für die Kontraktionsregulation beruht auf seinen besonderen Bindungseigenschaften [205]. Die schwache Interaktion von ALC1 mit Aktin erhöht die Verkürzungsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten, während die sehr starke Bindung von ALC1 an den Hebelarm der schweren Myosinkette (MyHC) die Kraftentwicklung steigert [206]. Auch die spezifische

Expressionsregulation von ALC-1 deutet auf wichtige Funktionen bei der Kontraktionsregulation des Herzens hin. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung wird ALC-1 in allen quergestreiften Muskeltypen exprimiert. Während der postnatalen Entwicklung beschränkt sich die ALC-1 Expression jedoch auf das Atrium. In den Ventrikeln wird die ventrikel-spezifische essentielle leichte Myosinkette (VLC-1) exprimiert. Unter pathologischen Bedingungen, wie bei Ischämie oder kardialer Hypertrophie, wurde jedoch eine Re-expression von ALC-1 in den Ventrikeln der Patienten beobachtet [207-210]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass infolge partieller Substitution der VLC-1 durch ALC-1 sowohl die Kontraktionsgeschwindigkeit als auch die Kontraktionskraft gesteigert werden konnte (positive Inotropie Eigenschaft von ALC-1) [152, 211-213]. Wie aber die ALC-1 Expression im Herzen reguliert wird, war bis dato kaum verstanden.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmalig zeigen, dass ALC-1 ein E2/ER α -Zielgen im humanen Herzen ist. Der E2-aktivierte ER α reduzierte signifikant die ALC-1 Expression in menschlichen atrialen Geweben beider Geschlechter und in humanen ventrikulären AC16-Zellen durch eine direkte Bindung an das ERE-Motiv innerhalb des humanen ALC-1 Promotors. Darüber hinaus induzierte E2 die nukleäre Translokation von ALC-1 in AC16-Zellen, wo ALC-1 den inhibitorischen Effekt von E2/ER α auf seinen eigenen Promotor verstärkte. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass humanes ALC-1 als Ko-Repressor von E2-aktiviertem ER α an der Regulation seiner eigenen Promotoraktivität, aber auch einiger anderen E2-Target-Promotoren (mit funktionellem ERE) in den Kardiomyozyten beteiligt ist. Es wurde in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig experimentell bewiesen, dass in den humanen Kardiomyozyten ALC-1 seine repressorische Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität des ER α durch eine direkte Bindung an ER α ausübt. Unsere Y2H Experimente sowie Immunfluoreszenz-Befunde belegen jedoch, dass humane ALC-1 und ER α in Anwesenheit von E2 miteinander interagieren, und somit im Komplex die Expression von E2-Zielgenen regulieren können. Darüber hinaus zeigten unsere Y2H Analysen, dass zusätzlich zu dem humanen ALC-1 Full-length auch das N-terminale Ende vom humanen ALC-1 in Anwesenheit von E2 mit ER α interagiert. Dieses N-terminale Ende enthält ein PXXP-Motiv (P: Prolin; X: beliebige Aminosäuren) zwischen den Aminosäuren 31-34, welches zum ersten Mal in PELP1 (*proline, glutamic acid, leucine-*

rich protein 1) identifiziert wurde, das als ein Ko-Regulator des ER α bekannt ist [214, 215]. PELP1 wurde als Adapterprotein beschrieben, das ER α mit anderen Proteinen verbindet, die zusammen sowohl die genomische als auch die nicht-genomische Wirkung von E2 vermitteln [214-216]. Es wäre von daher denkbar, dass die N-terminale Region des humanen ALC-1 mit E2-aktiviertem ER α und einem weiteren noch unbekanntem Adapter-Protein, wie für PELP1 berichtet, in einem Komplex interagiert und die transkriptionelle Aktivität des E2-aktivierten ER α in den humanen Kardiomyozyten unterdrückt.

Unsere Immunfluoreszenz Analysen zeigten noch zusätzlich eine Bindung des ER α an die A-Bande des Sarkomers und eine Ko-Lokalisation mit ALC-1 in den humanen Atriumproben. Wir nahmen von daher an, dass dies zu einer direkten Modulation der kontraktile Funktion der Kardiomyozyten und damit zu einer Veränderung der Herzleistung führen könnte. Wie erwartet, zeigten die mit AdvALC-1 infizierten Maus-Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrollen, eine signifikante Zunahme der Verkürzungsamplitude und schnellere Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten, unabhängig vom Ca²⁺-Aktivierungslevel. E2 inhibierte die Überexpression vom humanen ALC-1 in den Kardiomyozyten, und konterkarierte die ALC1-vermittelte Verbesserung der kontraktile Funktion in den Kardiomyozyten, wodurch die Verkürzungsamplitude signifikant reduziert und die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten signifikant abgeschwächt wurden. Dieses Phänomen könnte für die ALC-1 bedingten Kompensationsprozesse in den überbelasteten Herzen und die Erhaltung der Herzfunktion von Bedeutung sein.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die E2-induzierte Interaktion von humanem ALC1 mit ER α in Kardiomyozyten ein bislang unbekannter Mechanismus ist, der in physiologischen und / oder pathologischen Prozessen im Herzen wichtig sein können, indem sie die transkriptionelle Aktivität von ER α im Herzen regulieren und die kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten modulieren.

3.3. In vivo Analyse der Rolle von ER α in einem transgenen Mausmodell mit Kardiomyozyten-spezifischen ER α -Überexpression

Durch den Einsatz von systemischen ER α -Knockout Mäusen oder pharmakologischen Substanzen, wie spezifische ER α -Agonisten oder Antagonisten, konnte gezeigt werden,

dass der ER α bei ischämischen Herzen eine protektive Rolle spielt, und die Herzfunktion nach einer Ischämie wieder herstellen kann. Diese Ansätze haben allerdings gewisse Limitationen. Da ER α in fast allen Organen exprimiert wird, konnten bei diesen Ansätzen der systemische Effekt des ER α nicht ausgeschlossen werden, und es blieb bis dahin offen, ob die beobachteten Effekte im Herzen nur aufgrund der Aktivität von ER α im Herzen verursacht werden. Die Tatsache, dass es bei einem Herzinfarkt, als Folge einer Minderversorgung mit Sauerstoff, zum massiven Absterben überwiegend von Kardiomyozyten im Infarktbereich kommt, zeigt, dass Kardiomyozyten im Vergleich zu anderen Herzzelltypen anfälliger für Ischämie sind [217]. Um die Rolle von ER α speziell in Kardiomyozyten nach einer Ischämie analysieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Tet-Off-Systems eine neue transgene Mauslinie hergestellt, bei der ER α nur in Kardiomyozyten kontinuierlich überexprimiert (ER α -OE) wird (Manuskript 2.6, [156]). Dieses Modell ermöglichte die Untersuchung der Rolle von ER α in den Kardiomyozyten unter basalen und pathologischen Bedingungen ohne eine Interferenz mit systemischen Wirkungen des ER α .

Kardiomyozyten-spezifische ER α -Überexpression führte in beiden Geschlechtern zur Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie, die mit einer signifikant erhöhten linksventrikulären Masse, größerer systolischer und diastolischer Volumina, jedoch mit keiner Veränderung der Herzwanddicke, einer Zunahme des Längenwachstums der Kardiomyozyten, und einer verstärkten Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene wie NPPA und NPPB einherging. Zusätzlich entwickelten diese Mäuse keine kardiale Fibrose. In Übereinstimmung mit unseren Befunden zeigten Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen ER α -Deletion beider Geschlechter eine Abnahme der linksventrikulären Masse, sowie der linksventrikulären Volumina in den Herzen [218]. Eine weitere Bestätigung für die von uns erhobenen Befunde ist die Beobachtung, dass ER α in den Kardiomyozyten mit dem Wachstum der Herzmasse assoziiert ist [219]. Die beobachteten Effekte können z.T. auf direkte Wirkungen von ER α als Transkriptionsfaktor zurückzuführen sein, denn die immunhistochemischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten eine starke nukleäre Lokalisation von ER α in den Kernen der Kardiomyozyten der ER α -OE Mäuse, was zusammen mit der erhöhten Phosphorylierung des ER α an Ser118 auf eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des ER α als Transkriptionsfaktor bei ER α -OE Mäusen hindeutet. Diese

Befunde zeigen, dass ER α das Wachstum der Kardiomyozyten und somit die Erhöhung der Herzmasse bei beiden Geschlechtern unter basalen Bedingungen kontrolliert.

Unter pathologischen Bedingungen, nach einer Induktion des Myokardinfarktes, war die Mortalität innerhalb der akuten Phase (ersten 24h) des Myokardinfarktes" unter allen Gruppen hoch. Nach dieser akuten Phase jedoch überlebten die weiblichen ER α -OE Mäuse vollständig (100%), was darauf hindeutet, dass die ER α -Überexpression nur bei den weiblichen Herzen das Überleben nach einem Myokardinfarkt erhöhte. Die Induktion des Myokardinfarktes führte im Vergleich zu WT- und männlichen ER α -OE Mäusen nur bei den weiblichen ER α -OE Herzen nicht zu einer Erhöhung der systolischen und diastolischen Volumina und einer Verringerung des linksventrikulären Wanddicken. Dies können zu einer verminderten Wandbelastung und somit zu einer Verlangsamung nachteiliger post-infarzieller Remodellingsprozesse in den Herzen der weiblichen ER α -OE Mäuse führen. Tatsächlich konnte eine abgeschwächte Fibrose nur in den Herzen der weiblichen ER α -OE Mäuse nach dem Myokardinfarkt nachgewiesen werden. Diese Daten werden durch eine Studie bestätigt, die zeigte, dass der ER α signifikant an der Hemmung kardialer Fibrose bei weiblichen Mäusen beteiligt ist [220].

In der vorgelegten Arbeit konnte eine verstärkte Angiogenese und Lymphangiogenese im Peri-Infarktbereich von den Herzen der ER α -OE Mäuse bei beiden Geschlechtern nachgewiesen werden, was auf die Rolle von ER α bei der Induktion der Angiogenese und Lymphangiogenese im Herzen nach Myokardinfarkt hindeutet. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit anderen Studien, die nachgewiesen haben, dass die bekannten pro-angiogenetischen Eigenschaften von E2 hauptsächlich durch ER α in verschiedenen Geweben unter normalen und pathologischen Bedingungen vermittelt werden [221-223]. Der Angiogenese-Prozess ist bei ERKO-Mäusen oder bei einer Behandlung mit ER α -Antagonisten beeinträchtigt und wird durch ER α -Agonisten beschleunigt [224-229]. Bis dato war nicht klar, inwieweit ER α die Lymphangiogenese im Herzen nach einem Myokardinfarkt beeinflusst. Wir konnten in der vorgelegten Arbeit erstmalig die Beteiligung von ER α an der Verstärkung der kardialen Lymphangiogenese nach dem Myokardinfarkt zeigen.

Beide Prozesse, Angiogenese und Lymphangiogenese, sind aufgrund ihrer wichtigen Rollen bei der Wundheilung und Gewebereparatur von hohem klinischen Interesse, denn hierbei werden neue Blutgefäße bzw. neue Lymphgefäße aus bereits

existierenden Gefäßen im Peri-Infarkt- und Infarktbereich gebildet. Die Angiogenese erleichtert die Zufuhr von Sauerstoff- und Energiesubstraten in den Peri-Infarkt- und Infarktbereich und dadurch werden die Zellen um die betroffene Läsion in frühen Stadien nach dem Myokardinfarkt vor dem Absterben geschützt [230]. Die Lymphangiogenese verbessert den Abtransport von Stoffwechselprodukten aus dem Peri-Infarktbereich und fördert somit den Rückgang der Entzündung in diesem Bereich, wodurch ein Auslöser für die Entwicklung der interstitiellen Fibrose reduziert wird [231-233].

Obwohl die ER α -OE die Neovaskularisierung im Peri-Infarktbereich bei beiden Geschlechtern erhöhte, zeigten paradoxerweise nur die weiblichen ER α -OE Mäuse nach dem Myokardinfarkt eine abgeschwächte kardiale Fibrose. Unsere Studie legt daher nahe, dass ER α in Kardiomyozyten durch die Verbesserung der vaskulären Struktur und Funktion und durch die Verringerung der kardialen Fibrose das Ausmaß des ischämischen Schadens in den weiblichen ER α -OE Herzen verringert und das Überleben der weiblichen ER α -OE Mäuse begünstigt, und somit die ER α -OE als Reaktion auf Myokardinfarkt nur bei weiblichen Mäusen kardioprotektiv wirkt. Obwohl die männlichen ER α -OE-Mäuse auch eine höhere Aktivierung der Angiogenese und Lymphangiogenese zeigten, waren diese offensichtlich nicht ausreichend, um die nachteiligen post-infarziellen Remodellingsprozessen in Männchen entgegenzuwirken. Auch wenn ein Überexpressionsmodell den ER α -Effekt in einer physiologischen Umgebung nicht genau widerspiegelt, kann dies trotzdem die möglichen Wirkungen von spezifischen ER α -Agonisten auf Kardiomyozyten, die ein therapeutisches Potential bei der Behandlung von ischämischen Herzerkrankungen haben, veranschaulichen.

4. Zusammenfassung und Ausblicke

Zahlreiche Studien weisen auf eine kausale Rolle von E2 und ER α in der Physiologie und Pathophysiologie des Myokards hin, die zugrunde liegenden Mechanismen im menschlichen Herzen sind allerdings noch nicht genügend verstanden. Die Analyse der grundlegenden Mechanismen der Regulierung der ER α -Expression, der ER α -Lokalisation, sowie die Identifizierung der interagierenden Protein-Partner des ER α und der Wirkungsweise von ER α speziell in Kardiomyozyten in gesunden und erkrankten Herzen können zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von E2 und ER α im Herzen beitragen. Dies erlaubt die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung dieser zellulären Mechanismen im Herzen.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten konnte erstmalig die ER α -Expression, -Lokalisation und -Interaktion mit anderen kardialen Proteinen im menschlichen Herzen nachgewiesen werden. ER α wurde im Zytoplasma, im Sarkolemma und in den Glanzstreifen humaner Kardiomyozyten, sowie in den Kernen von Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen lokalisiert. Interessanterweise beobachteten wir in den Herzen von Patienten mit AS und DCM eine Hochregulation der ER α Expression und eine Krankheitsabhängige Re-Lokalisation des sich im gesunden Herzen auf den Glanzstreifen der Kardiomyozyten befindlichen ER α , wobei die Ko-Lokalisation mit β -Catenin, welche in den gesunden Herzen beobachtet wurde, verloren ging. Diese Befunde deuten darauf hin, dass ER α im humanen Herzen funktionell aktiv ist und eine Rolle bei der Entwicklung der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz spielt. In einer weiteren Arbeit identifizierten wir die Promotorvarianten A, B, C und F, welche die Expression des ER α Gens im humanen Herzen regulieren, wobei der distale F-Promotor die dominierende Variante ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der NF- κ B-Signalweg an der Regulation der ER α -Expression im menschlichen Herzen beteiligt ist. Ferner konnte eine eindeutige Wechselwirkung (antagonistischer Effekt) zwischen E2/ER α und den prohypertrophen und proinflammatorischen Reaktionen auf die NF- κ B Signalwege identifiziert werden. Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit der Identifizierung der Protein-Interaktionspartner von ER α im humanen Herzen. Dabei haben wir humane NPPA und ALC-1 als bislang unbekannte kardiale Interaktionspartner von ER α identifiziert, die nur in Anwesenheit von E2 mit ER α

interagieren. Im Zellkern der Kardiomyozyten fungieren sie als Ko-Repressoren des E2-aktivierten ER α , und regulieren somit auch die Expression von E2-Zielgenen. Zusätzlich zur nukleären Funktion der E2-induzierten ER α /ALC-1 Interaktion konnten wir zeigen, dass chronische E2-Behandlung adulter Maus-Kardiomyozyten, die humanes ALC-1 überexprimieren, den ALC-1-vermittelten positiv intropen Effekt abschwächt, welche für die Kompensationsprozesse in den überbelasteten Herzen und die Erhaltung der Herzfunktion von Bedeutung sein könnte.

Um den *in vivo* Rolle des ER α speziell in den Kardiomyozyten unter pathologischen Bedingungen zu analysieren, wurden weibliche und männliche Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer Überexpression von ER α einem Myokardinfarkt unterzogen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass ER α nur die weiblichen Maus-Kardiomyozyten durch die Verbesserung der vaskulären Struktur und Funktion (erhöhte Angiogenese/Lymphangiogenese) und die Reduktion des kardialen Remodellings (beeinträchtigte Fibrose) vor den Folgen der Ischämie schützt.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass ER α auch im humanen Herzen funktionell aktiv ist und zusammen mit anderen ko-regulatorischen Proteinen die genomischen und nicht-genomischen Effekte von E2 vermittelt, die bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Herzen eine wichtige Rolle spielen. Unsere Arbeit beantwortet zwar einige grundlegende Fragen zur Funktion des E2/ER α im humanen Herzen, jedoch ist das Gesamtbild der E2/ER α Wirkmechanismen im Herzen viel komplexer, denn die Funktionen bereits beschriebene ER α -Interaktionspartner bzw. Ko-Regulatoren sind noch weitgehend unbekannt, und es ist nicht auszuschließen noch weitere bislang nicht identifizierte ER α -Interaktionspartner im Herzen existieren. Daher ist weitere Forschung zur Identifizierung und Charakterisierung der ER-Interaktionspartner bzw. Ko-Regulatoren, welche die E2/ER α Signalwege im Herzen unter physiologischen und/oder pathologischen Bedingungen beeinflussen, erforderlich. Ein detaillierteres Verständnis der Rolle der E2/ER α Signalwege und ihrer Wirkmechanismen im Herzen ist eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuartiger Medikamente, die bei kardiovaskulären Erkrankungen spezifischer wirken, und somit bei beiden Geschlechtern therapeutisch eingesetzt werden können.

5. Literaturverzeichnis

1. Bittner, V. (2009). Menopause, age, and cardiovascular risk: a complex relationship. *J Am Coll Cardiol* 54, 2374-2375.
2. Crabbe, D.L., Dipla, K., Ambati, S., Zafeiridis, A., Gaughan, J.P., Houser, S.R., and Margulies, K.B. (2003). Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts. *J Am Coll Cardiol* 41, 300-306.
3. Reckelhoff, J.F., and Maric, C. (2010). Sex and gender differences in cardiovascular-renal physiology and pathophysiology. *Steroids* 75, 745-746.
4. Regitz-Zagrosek, V. (2006). Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 425-438.
5. Barrett-Connor, E. (1997). Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 95, 252-264.
6. Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (2005). Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 308, 1583-1587.
7. Aurigemma, G.P., Silver, K.H., McLaughlin, M., Mauser, J., and Gaasch, W.H. (1994). Impact of chamber geometry and gender on left ventricular systolic function in patients > 60 years of age with aortic stenosis. *Am J Cardiol* 74, 794-798.
8. Carroll, J.D., Carroll, E.P., Feldman, T., Ward, D.M., Lang, R.M., McGaughey, D., and Karp, R.B. (1992). Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation* 86, 1099-1107.
9. Cleland, J.G., Swedberg, K., Follath, F., Komajda, M., Cohen-Solal, A., Aguilar, J.C., *et al.* (2003). The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* 24, 442-463.
10. Petrov, G., Regitz-Zagrosek, V., Lehmkuhl, E., Krabatsch, T., Dunkel, A., Dandel, M., *et al.* (2010). Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: faster in women? *Circulation* 122, S23-28.
11. Adams, K.F., Jr., Dunlap, S.H., Sueta, C.A., Clarke, S.W., Patterson, J.H., Blauwet, M.B., Jensen, L.R., Tomasko, L., and Koch, G. (1996). Relation between gender, etiology and survival in patients with symptomatic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28, 1781-1788.
12. Levy, D., Kenchaiah, S., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Kupka, M.J., Ho, K.K., Murabito, J.M., and Vasan, R.S. (2002). Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 347, 1397-1402.
13. Ambale Venkatesh, B., Volpe, G.J., Donekal, S., Mewton, N., Liu, C.Y., Shea, S., *et al.* (2014). Association of longitudinal changes in left ventricular structure and function with myocardial fibrosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis study. *Hypertension* 64, 508-515.
14. Campbell, D.J., Somaratne, J.B., Jenkins, A.J., Prior, D.L., Yip, M., Kenny, J.F., Newcomb, A.E., Kelly, D.J., and Black, M.J. (2011). Differences in myocardial structure and coronary microvasculature between men and women with coronary artery disease. *Hypertension* 57, 186-192.
15. Petrov, G., Dworatzek, E., Schulze, T.M., Dandel, M., Kararigas, G., Mahmoodzadeh, S., Knosalla, C., Hetzer, R., and Regitz-Zagrosek, V. (2014). Maladaptive remodeling is associated with impaired survival in women but not in men after aortic valve replacement. *JACC. Cardiovascular imaging* 7, 1073-1080.
16. Villari, B., Campbell, S.E., Schneider, J., Vassalli, G., Chiariello, M., and Hess, O.M. (1995). Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J* 16, 1410-1419.
17. Guerra, S., Leri, A., Wang, X., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Kajstura, J., and Anversa, P. (1999). Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res* 85, 856-866.

18. Fliegner, D., Schubert, C., Penkalla, A., Witt, H., Kararigas, G., Dworatzek, E., *et al.* (2010). Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R1597-1606.
19. Skavdahl, M., Steenbergen, C., Clark, J., Myers, P., Demianenko, T., Mao, L., Rockman, H.A., Korach, K.S., and Murphy, E. (2005). Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H469-476.
20. Witt, H., Schubert, C., Jaekel, J., Fliegner, D., Penkalla, A., Tiemann, K., *et al.* (2008). Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med (Berl)* **86**, 1013-1024.
21. Cavaasin, M.A., Tao, Z., Menon, S., and Yang, X.P. (2004). Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci* **75**, 2181-2192.
22. Fang, L., Gao, X.M., Moore, X.L., Kiriazis, H., Su, Y., Ming, Z., Lim, Y.L., Dart, A.M., and Du, X.J. (2007). Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 535-544.
23. Schuster, I., Mahmoodzadeh, S., Dworatzek, E., Jaisser, F., Messaoudi, S., Morano, I., and Regitz-Zagrosek, V. (2016). Cardiomyocyte-specific overexpression of oestrogen receptor beta improves survival and cardiac function after myocardial infarction in female and male mice. *Clin Sci (Lond)* **130**, 365-376.
24. Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* **346**, 340-352.
25. Singh, M., Dykens, J.A., and Simpkins, J.W. (2006). Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 514-521.
26. Khosla, S., Atkinson, E.J., Melton, L.J., 3rd, and Riggs, B.L. (1997). Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1522-1527.
27. Safi, R., Kovacic, A., Gaillard, S., Murata, Y., Simpson, E.R., McDonnell, D.P., and Clyne, C.D. (2005). Coactivation of liver receptor homologue-1 by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha on aromatase promoter II and its inhibition by activated retinoid X receptor suggest a novel target for breast-specific antiestrogen therapy. *Cancer Res* **65**, 11762-11770.
28. Deroo, B.J., and Korach, K.S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* **116**, 561-570.
29. Mendelsohn, M.E. (2002). Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol* **89**, 12E-17E; discussion 17E-18E.
30. Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* **340**, 1801-1811.
31. Reginster, J.Y., and Devogelaer, J.P. (2006). Raloxifene reduces fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* **443**, 48-54.
32. Malhotra, A., Buttrick, P., and Scheuer, J. (1990). Effects of sex hormones on development of physiological and pathological cardiac hypertrophy in male and female rats. *Am J Physiol* **259**, H866-871.
33. van Eickels, M., Grohe, C., Cleutjens, J.P., Janssen, B.J., Wellens, H.J., and Doevendans, P.A. (2001). 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **104**, 1419-1423.
34. Patten, R.D., and Karas, R.H. (2006). Estrogen replacement and cardiomyocyte protection. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 69-75.

35. Pedram, A., Razandi, M., Aitkenhead, M., and Levin, E.R. (2005). Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem* 280, 26339-26348.
36. Grodstein, F., Chen, J., Pollen, D.A., Albert, M.S., Wilson, R.S., Folstein, M.F., Evans, D.A., and Stampfer, M.J. (2000). Postmenopausal hormone therapy and cognitive function in healthy older women. *J Am Geriatr Soc* 48, 746-752.
37. Grodstein, F., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Manson, J.E., Joffe, M., *et al.* (1997). Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med* 336, 1769-1775.
38. Salpeter, S.R., Walsh, J.M., Greyber, E., Ormiston, T.M., and Salpeter, E.E. (2004). Mortality associated with hormone replacement therapy in younger and older women: a meta-analysis. *Journal of general internal medicine* 19, 791-804.
39. Schierbeck, L.L., Rejnmark, L., Tofteng, C.L., Stilgren, L., Eiken, P., Mosekilde, L., Kober, L., and Jensen, J.E. (2012). Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ* 345, e6409.
40. Anderson, G.L., Limacher, M., Assaf, A.R., Bassford, T., Beresford, S.A., Black, H., *et al.* (2004). Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 291, 1701-1712.
41. Grady, D., Herrington, D., Bittner, V., Blumenthal, R., Davidson, M., Hlatky, M., *et al.* (2002). Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA : the journal of the American Medical Association* 288, 49-57.
42. Harman, S.M. (2006). Estrogen replacement in menopausal women: recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS. *Gender medicine* 3, 254-269.
43. Manson, J.E., Hsia, J., Johnson, K.C., Rossouw, J.E., Assaf, A.R., Lasser, N.L., *et al.* (2003). Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 349, 523-534.
44. Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., *et al.* (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 288, 321-333.
45. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
46. Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154.
47. Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-5930.
48. Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* 392, 49-53.
49. Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F., and Giguere, V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11, 353-365.
50. Gosden, J.R., Middleton, P.G., and Rout, D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 43, 218-220.
51. Taylor, S.E., Martin-Hirsch, P.L., and Martin, F.L. (2010). Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer letters* 288, 133-148.
52. Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* 81, 1269-1304.

53. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704.
54. Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *The EMBO journal* 5, 891-897.
55. Meier, C.A. (1997). Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *Journal of receptor and signal transduction research* 17, 319-335.
56. Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276, 9817-9824.
57. Joel, P.B., Traish, A.M., and Lannigan, D.A. (1998). Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 13317-13323.
58. Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.
59. Rogatsky, I., Trowbridge, J.M., and Garabedian, M.J. (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274, 22296-22302.
60. Klinge, C.M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251.
61. Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research* 29, 2905-2919.
62. Druége, P.M., Klein-Hitpass, L., Green, S., Stack, G., Chambon, P., and Ryffel, G.U. (1986). Introduction of estrogen-responsiveness into mammalian cell lines. *Nucleic acids research* 14, 9329-9337.
63. Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., and Chambon, P. (1988). The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *The EMBO journal* 7, 3037-3044.
64. Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J.M., and Moras, D. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast cancer research : BCR* 2, 353-359.
65. Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current opinion in cell biology* 10, 384-391.
66. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
67. Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *The EMBO journal* 13, 5370-5382.
68. Norris, J.D., Fan, D., Kerner, S.A., and McDonnell, D.P. (1997). Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11, 747-754.
69. Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in pharmacological sciences* 21, 381-388.

70. Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., and West, B.L. (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* *280*, 1747-1749.
71. Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* *95*, 927-937.
72. Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Current opinion in cell biology* *10*, 373-383.
73. Peters, G.A., and Khan, S.A. (1999). Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol* *13*, 286-296.
74. Koide, A., Zhao, C., Naganuma, M., Abrams, J., Deighton-Collins, S., Skafar, D.F., and Koide, S. (2007). Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions. *Mol Endocrinol* *21*, 829-842.
75. Schwartz, J.A., Zhong, L., Deighton-Collins, S., Zhao, C., and Skafar, D.F. (2002). Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor-alpha alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J Biol Chem* *277*, 13202-13209.
76. Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Molecular cell* *5*, 939-948.
77. Klein-Hitpass, L., Tsai, S.Y., Greene, G.L., Clark, J.H., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1989). Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Mol Cell Biol* *9*, 43-49.
78. Roche, P.J., Hoare, S.A., and Parker, M.G. (1992). A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* *6*, 2229-2235.
79. Wood, J.R., Likhite, V.S., Loven, M.A., and Nardulli, A.M. (2001). Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* *15*, 1114-1126.
80. Hall, J.M., Couse, J.F., and Korach, K.S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* *276*, 36869-36872.
81. Heldring, N., Pawson, T., McDonnell, D., Treuter, E., Gustafsson, J.A., and Pike, A.C. (2007). Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors. *J Biol Chem* *282*, 10449-10455.
82. Kalaitzidis, D., and Gilmore, T.D. (2005). Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *16*, 46-52.
83. Umayahara, Y., Kawamori, R., Watada, H., Imano, E., Iwama, N., Morishima, T., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., and Kamada, T. (1994). Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* *269*, 16433-16442.
84. de Jager, T., Pelzer, T., Muller-Botz, S., Imam, A., Muck, J., and Neyses, L. (2001). Mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. Rapid gene activation via the ERK1/2 pathway and serum response elements. *J Biol Chem* *276*, 27873-27880.
85. Kousteni, S., Han, L., Chen, J.R., Almeida, M., Plotkin, L.I., Bellido, T., and Manolagas, S.C. (2003). Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* *111*, 1651-1664.
86. Lannigan, D.A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* *68*, 1-9.
87. Madak-Erdogan, Z., Kieser, K.J., Kim, S.H., Komm, B., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2008). Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol* *22*, 2116-2127.

88. Mahmoodzadeh, S., Dworatzek, E., Fritschka, S., Pham, T.H., and Regitz-Zagrosek, V. (2010). 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. *Cardiovasc Res* *85*, 719-728.
89. Song, R.X., McPherson, R.A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R., and Santen, R.J. (2002). Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* *16*, 116-127.
90. Dworatzek, E., and Mahmoodzadeh, S. (2017). Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. *Pharmacological research* *119*, 27-35.
91. Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., Smith, H.O., Oprea, T.I., Sklar, L.A., and Hathaway, H.J. (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* *70*, 165-190.
92. Simoncini, T., Mannella, P., and Genazzani, A.R. (2006). Rapid estrogen actions in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* *1089*, 424-430.
93. Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO journal* *15*, 2174-2183.
94. Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., and Korach, K.S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 4658-4662.
95. Ignar-Trowbridge, D.M., Teng, C.T., Ross, K.A., Parker, M.G., Korach, K.S., and McLachlan, J.A. (1993). Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol Endocrinol* *7*, 992-998.
96. Lonard, D.M., and O'Malley B, W. (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Molecular cell* *27*, 691-700.
97. Cheskis, B.J., Greger, J.G., Nagpal, S., and Freedman, L.P. (2007). Signaling by estrogens. *J Cell Physiol* *213*, 610-617.
98. Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* *387*, 733-736.
99. Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M.P., *et al.* (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol* *12*, 1605-1618.
100. Hu, X., Li, Y., and Lazar, M.A. (2001). Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* *21*, 1747-1758.
101. Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. (2006). The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* *125*, 411-414.
102. Hu, X., and Lazar, M.A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* *402*, 93-96.
103. Jepsen, K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *Journal of cell science* *115*, 689-698.
104. Georgescu, S.P., Li, J.H., Lu, Q., Karas, R.H., Brown, M., and Mendelsohn, M.E. (2005). Modulator recognition factor 1, an AT-rich interaction domain family member, is a novel corepressor for estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* *19*, 2491-2501.
105. Martini, P.G., and Katzenellenbogen, B.S. (2003). Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* *85*, 117-122.
106. Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, K., Stimpel, M., Karas, R.H., Vetter, H., and Neyses, L. (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS letters* *416*, 107-112.

107. Lizotte, E., Grandy, S.A., Tremblay, A., Allen, B.G., and Fiset, C. (2009). Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 23, 75-86.
108. Weinberg, E.O., Thienelt, C.D., Katz, S.E., Bartunek, J., Tajima, M., Rohrbach, S., Douglas, P.S., and Lorell, B.H. (1999). Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 34, 264-273.
109. Ropero, A.B., Eghbali, M., Minosyan, T.Y., Tang, G., Toro, L., and Stefani, E. (2006). Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. *J Mol Cell Cardiol* 41, 496-510.
110. Karas, R.H., Patterson, B.L., and Mendelsohn, M.E. (1994). Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 89, 1943-1950.
111. Losordo, D.W., Kearney, M., Kim, E.A., Jekanowski, J., and Isner, J.M. (1994). Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 89, 1501-1510.
112. Rubanyi, G.M., Freay, A.D., Kauser, K., Sukovich, D., Burton, G., Lubahn, D.B., Couse, J.F., Curtis, S.W., and Korach, K.S. (1997). Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest* 99, 2429-2437.
113. Venkov, C.D., Rankin, A.B., and Vaughan, D.E. (1996). Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94, 727-733.
114. Arnal, J.F., Laurell, H., Lenfant, F., Douin-Echinard, V., Brouchet, L., and Gourdy, P. (2006). Estradiol action in atherosclerosis and reendothelialization. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*, 69-86.
115. Rubanyi, G.M., Kauser, K., and Johns, A. (2002). Role of estrogen receptors in the vascular system. *Vascul Pharmacol* 38, 81-88.
116. Poola, I., Abraham, J., and Baldwin, K. (2002). Identification of ten exon deleted ERbeta mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor beta mRNA is distinct from that of estrogen receptor alpha. *FEBS letters* 516, 133-138.
117. Poola, I., Koduri, S., Chatra, S., and Clarke, R. (2000). Identification of twenty alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs in breast cancer cell lines and tumors using splice targeted primer approach. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72, 249-258.
118. Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *The EMBO journal* 19, 4688-4700.
119. Irsik, D.L., Carmines, P.K., and Lane, P.H. (2013). Classical estrogen receptors and ERalpha splice variants in the mouse. *PLoS One* 8, e70926.
120. Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15, 2057-2063.
121. Okuda, Y., Hirata, S., Watanabe, N., Shoda, T., Kato, J., and Hoshi, K. (2003). Novel splicing events of untranslated first exons in human estrogen receptor alpha (ER alpha) gene. *Endocr J* 50, 97-104.
122. Thompson, D.A., McPherson, L.A., Carmeci, C., deConinck, E.C., and Weigel, R.J. (1997). Identification of two estrogen receptor transcripts with novel 5' exons isolated from a MCF7 cDNA library. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62, 143-153.

123. Grandien, K. (1996). Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform. *Mol Cell Endocrinol* *116*, 207-212.
124. Brand, H., Kos, M., Denger, S., Flouriot, G., Gromoll, J., Gannon, F., and Reid, G. (2002). A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor alpha in human testis and epididymis. *Endocrinology* *143*, 3397-3404.
125. Lambertini, E., Penolazzi, L., Giordano, S., Del Senno, L., and Piva, R. (2003). Expression of the human oestrogen receptor-alpha gene is regulated by promoter F in MG-63 osteoblastic cells. *Biochem J* *372*, 831-839.
126. Li, L.C., Yeh, C.C., Nojima, D., and Dahiya, R. (2000). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta promoter. *Biochemical and biophysical research communications* *275*, 682-689.
127. Post, W.S., Goldschmidt-Clermont, P.J., Wilhide, C.C., Heldman, A.W., Sussman, M.S., Ouyang, P., Milliken, E.E., and Issa, J.P. (1999). Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* *43*, 985-991.
128. Oberkofler, H., Holzl, B., Esterbauer, H., Xie, M., Iglseder, B., Krempler, F., Paulweber, B., and Patsch, W. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: associations with hypertension in middle-aged men. *Hypertension* *41*, 368-372.
129. Wang, M., Crisostomo, P., Wairiuko, G.M., and Meldrum, D.R. (2006). Estrogen receptor-alpha mediates acute myocardial protection in females. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *290*, H2204-2209.
130. Zhai, P., Eurell, T.E., Cooke, P.S., Lubahn, D.B., and Gross, D.R. (2000). Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *278*, H1640-1647.
131. Booth, E.A., Obeid, N.R., and Lucchesi, B.R. (2005). Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *289*, H2039-2047.
132. Jeanes, H.L., Tabor, C., Black, D., Ederveen, A., and Gray, G.A. (2008). Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER)alpha agonist and unaffected by an ER beta antagonist. *J Endocrinol* *197*, 493-501.
133. Novotny, J.L., Simpson, A.M., Tomicek, N.J., Lancaster, T.S., and Korzick, D.H. (2009). Rapid estrogen receptor-alpha activation improves ischemic tolerance in aged female rats through a novel protein kinase C epsilon-dependent mechanism. *Endocrinology* *150*, 889-896.
134. Vornehm, N.D., Wang, M., Abarbanell, A., Herrmann, J., Weil, B., Tan, J., Wang, Y., Kelly, M., and Meldrum, D.R. (2009). Acute postischemic treatment with estrogen receptor-alpha agonist or estrogen receptor-beta agonist improves myocardial recovery. *Surgery* *146*, 145-154.
135. Sugden, P.H., and Clerk, A. (1998). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* *76*, 725-746.
136. Wang, Y., Huang, S., Sah, V.P., Ross, J., Jr., Brown, J.H., Han, J., and Chien, K.R. (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* *273*, 2161-2168.
137. Babiker, F.A., De Windt, L.J., van Eickels, M., Thijssen, V., Bronsaer, R.J., Grohe, C., van Bilsen, M., and Doevendans, P.A. (2004). 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation* *109*, 269-276.
138. Rosenkranz, A.C., Woods, R.L., Dusting, G.J., and Ritchie, R.H. (2003). Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc Res* *57*, 515-522.

139. Babiker, F.A., Lips, D., Meyer, R., Delvaux, E., Zandberg, P., Janssen, B., van Eys, G., Grohe, C., and Doevendans, P.A. (2006). Estrogen Receptor {beta} Protects the Murine Heart Against Left Ventricular Hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, epub ahead of print.
140. Johnson, B.D., Zheng, W., Korach, K.S., Scheuer, T., Catterall, W.A., and Rubanyi, G.M. (1997). Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol* *110*, 135-140.
141. Modena, M.G., Muia, N., Jr., Aveta, P., Molinari, R., and Rossi, R. (1999). Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension* *34*, 1041-1046.
142. Nordmeyer, J., Eder, S., Mahmoodzadeh, S., Martus, P., Fielitz, J., Bass, J., *et al.* (2004). Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation* *110*, 3270-3275.
143. Mahmoodzadeh, S., Eder, S., Nordmeyer, J., Ehler, E., Huber, O., Martus, P., Weiske, J., Pregla, R., Hetzer, R., and Regitz-Zagrosek, V. (2006). Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J* *20*, 926-934.
144. Mahmoodzadeh, S., Fritschka, S., Dworatzek, E., Pham, T.H., Becher, E., Kuehne, A., Davidson, M.M., and Regitz-Zagrosek, V. (2009). Nuclear factor-kappaB regulates estrogen receptor-alpha transcription in the human heart. *J Biol Chem* *284*, 24705-24714.
145. Barnes, C.J., Vadlamudi, R.K., and Kumar, R. (2004). Novel estrogen receptor coregulators and signaling molecules in human diseases. *Cell Mol Life Sci* *61*, 281-291.
146. McKenna, N.J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* *69*, 3-12.
147. Rosenfeld, M.G., Lunnyak, V.V., and Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development* *20*, 1405-1428.
148. Burnett, J.C., Jr. (2006). Novel therapeutic directions for the natriuretic peptides in cardiovascular diseases: what's on the horizon. *Journal of cardiology* *48*, 235-241.
149. Xu, L., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 140-147.
150. Mahmoodzadeh, S., Pham, T.H., Kuehne, A., Fielitz, B., Dworatzek, E., Kararigas, G., Petrov, G., Davidson, M.M., and Regitz-Zagrosek, V. (2012). 17beta-Estradiol-induced interaction of ERalpha with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* *96*, 411-421.
151. Abdelaziz, A.I., Pagel, I., Schlegel, W.P., Kott, M., Monti, J., Haase, H., and Morano, I. (2005). Human atrial myosin light chain 1 expression attenuates heart failure. *Advances in experimental medicine and biology* *565*, 283-292; discussion 292, 405-215.
152. Abdelaziz, A.I., Segaric, J., Bartsch, H., Petzhold, D., Schlegel, W.P., Kott, M., *et al.* (2004). Functional characterization of the human atrial essential myosin light chain (hALC-1) in a transgenic rat model. *J Mol Med (Berl)* *82*, 265-274.
153. Lossie, J., Kohncke, C., Mahmoodzadeh, S., Steffen, W., Canepari, M., Maffei, M., *et al.* (2014). Molecular mechanism regulating myosin and cardiac functions by ELC. *Biochemical and biophysical research communications* *450*, 464-469.
154. CIBISII1999 (1999). The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* *353*, 9-13.
155. Duft, K., Schanz, M., Pham, H., Abdelwahab, A., Schriever, C., Kararigas, G., *et al.* (2017). 17beta-Estradiol-induced interaction of estrogen receptor alpha and human atrial essential myosin light chain modulates cardiac contractile function. *Basic research in cardiology* *112*, 1.
156. Mahmoodzadeh, S., Leber, J., Zhang, X., Jaisser, F., Messaoudi, S., Morano, I., Furth, P.A., Dworatzek, E., and Regitz-Zagrosek, V. (2014). Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha

- Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-Myocardial Infarction. *Journal of cell science & therapy* 5, 153.
157. Leibetseder, V., Humpeler, S., Zuckermann, A., Svoboda, M., Thalhammer, T., Marktl, W., and Ekmekcioglu, C. (2010). Time dependence of estrogen receptor expression in human hearts. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 64, 154-159.
 158. Nuedling, S., Kahlert, S., Loebbert, K., Doevendans, P.A., Meyer, R., Vetter, H., and Grohe, C. (1999). 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res* 43, 666-674.
 159. Arnold, S.F., Melamed, M., Vorojeikina, D.P., Notides, A.C., and Sasson, S. (1997). Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 11, 48-53.
 160. Patten, R.D., Pourati, I., Aronovitz, M.J., Baur, J., Celestin, F., Chen, X., *et al.* (2004). 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res* 95, 692-699.
 161. Kahlert, H., Grage-Griebenow, E., Stuwe, H.T., Cromwell, O., and Fiebig, H. (2000). T cell reactivity with allergoids: influence of the type of APC. *J Immunol* 165, 1807-1815.
 162. Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., *et al.* (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *The EMBO journal* 19, 5406-5417.
 163. Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., and Levin, E.R. (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16, 100-115.
 164. Chung, T.H., Wang, S.M., Liang, J.Y., Yang, S.H., and Wu, J.C. (2009). The interaction of estrogen receptor alpha and caveolin-3 regulates connexin43 phosphorylation in metabolic inhibition-treated rat cardiomyocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2323-2333.
 165. Chung, T.H., Wang, S.M., and Wu, J.C. (2004). 17beta-estradiol reduces the effect of metabolic inhibition on gap junction intercellular communication in rat cardiomyocytes via the estrogen receptor. *J Mol Cell Cardiol* 37, 1013-1022.
 166. Perriard, J.C., Hirschy, A., and Ehler, E. (2003). Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med* 13, 30-38.
 167. Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C., and Saffitz, J.E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83, 629-635.
 168. Beardslee, M.A., Lerner, D.L., Tadros, P.N., Laing, J.G., Beyer, E.C., Yamada, K.A., Kleber, A.G., Schuessler, R.B., and Saffitz, J.E. (2000). Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 87, 656-662.
 169. Lampe, P.D., Cooper, C.D., King, T.J., and Burt, J.M. (2006). Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *Journal of cell science* 119, 3435-3442.
 170. Severs, N.J., Bruce, A.F., Dupont, E., and Rothery, S. (2008). Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 80, 9-19.
 171. Wu, J.C., Tsai, R.Y., and Chung, T.H. (2003). Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 88, 823-835.
 172. Cardona-Gomez, P., Perez, M., Avila, J., Garcia-Segura, L.M., and Wandosell, F. (2004). Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 25, 363-373.
 173. Hertig, C.M., Eppenberger-Eberhardt, M., Koch, S., and Eppenberger, H.M. (1996). N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *Journal of cell science* 109 (Pt 1), 1-10.

174. Kouzmenko, A.P., Takeyama, K., Ito, S., Furutani, T., Sawatsubashi, S., Maki, A., *et al.* (2004). Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 279, 40255-40258.
175. Cohn, C.S., Sullivan, J.A., Kiefer, T., and Hill, S.M. (1999). Identification of an enhancer element in the estrogen receptor upstream region: implications for regulation of ER transcription in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 158, 25-36.
176. deConinck, E.C., McPherson, L.A., and Weigel, R.J. (1995). Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol Cell Biol* 15, 2191-2196.
177. Penolazzi, L., Lambertini, E., Aguiari, G., del Senno, L., and Piva, R. (2000). Cis element 'decoy' against the upstream promoter of the human estrogen receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1492, 560-567.
178. Schuur, E.R., McPherson, L.A., Yang, G.P., and Weigel, R.J. (2001). Genomic structure of the promoters of the human estrogen receptor-alpha gene demonstrate changes in chromatin structure induced by AP2gamma. *J Biol Chem* 276, 15519-15526.
179. Tang, Z., Treilleux, I., and Brown, M. (1997). A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers. *Mol Cell Biol* 17, 1274-1280.
180. Donaghue, C., Westley, B.R., and May, F.E. (1999). Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen. *Mol Endocrinol* 13, 1934-1950.
181. Griffin, C., Flouriot, G., Sonntag-Buck, V., Nestor, P., and Gannon, F. (1998). Identification of novel chicken estrogen receptor-alpha messenger ribonucleic acid isoforms generated by alternative splicing and promoter usage. *Endocrinology* 139, 4614-4625.
182. Denger, S., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2001). Tissue-specific expression of human ERalpha and ERbeta in the male. *Mol Cell Endocrinol* 178, 155-160.
183. Penolazzi, L., Lambertini, E., Giordano, S., Sollazzo, V., Traina, G., del Senno, L., and Piva, R. (2004). Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91, 1-9.
184. Flouriot, G., Griffin, C., Kenealy, M., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (1998). Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol* 12, 1939-1954.
185. Hodis, H.N., Mack, W.J., Azen, S.P., Lobo, R.A., Shoupe, D., Mahrer, P.R., *et al.* (2003). Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 349, 535-545.
186. Nakamura, Y., Suzuki, T., Miki, Y., Tazawa, C., Senzaki, K., Moriya, T., *et al.* (2004). Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 219, 17-26.
187. Gupta, S., Young, D., Maitra, R.K., Gupta, A., Popovic, Z.B., Yong, S.L., Mahajan, A., Wang, Q., and Sen, S. (2008). Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB. *J Mol Biol* 375, 637-649.
188. Kawano, S., Kubota, T., Monden, Y., Tsutsumi, T., Inoue, T., Kawamura, N., Tsutsui, H., and Sunagawa, K. (2006). Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1337-1344.
189. Onai, Y., Suzuki, J., Maejima, Y., Haraguchi, G., Muto, S., Itai, A., and Isobe, M. (2007). Inhibition of NF-kappaB improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H530-538.
190. Purcell, N.H., Tang, G., Yu, C., Mercurio, F., DiDonato, J.A., and Lin, A. (2001). Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6668-6673.
191. Stein, B., and Yang, M.X. (1995). Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* 15, 4971-4979.

192. Sun, W.H., Keller, E.T., Stebler, B.S., and Ershler, W.B. (1998). Estrogen inhibits phorbol ester-induced I kappa B alpha transcription and protein degradation. *Biochemical and biophysical research communications* 244, 691-695.
193. Deshpande, R., Khalili, H., Pergolizzi, R.G., Michael, S.D., and Chang, M.D. (1997). Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol* 38, 46-54.
194. Ray, P., Ghosh, S.K., Zhang, D.H., and Ray, A. (1997). Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS letters* 409, 79-85.
195. Harnish, D.C., Scicchitano, M.S., Adelman, S.J., Lyttle, C.R., and Karathanasis, S.K. (2000). The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells. *Endocrinology* 141, 3403-3411.
196. Speir, E., Yu, Z.X., Takeda, K., Ferrans, V.J., and Cannon, R.O., 3rd (2000). Competition for p300 regulates transcription by estrogen receptors and nuclear factor-kappaB in human coronary smooth muscle cells. *Circ Res* 87, 1006-1011.
197. Castles, C.G., Oesterreich, S., Hansen, R., and Fuqua, S.A. (1997). Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62, 155-163.
198. Brockhoff, C., Warnholtz, A., and Munzel, T. (2000). [Atrial natriuretic peptides: diagnostic and therapeutic potential]. *Therapeutische Umschau. Revue therapeutique* 57, 305-312.
199. de Bold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T., and Sonnenberg, H. (2001). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from *Life Sci.* 28:89-94, 1981. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12, 403-409; discussion 403-408, 408-409.
200. Cameron, V.A., Aitken, G.D., Ellmers, L.J., Kennedy, M.A., and Espiner, E.A. (1996). The sites of gene expression of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides in mouse fetal development: temporal changes in embryos and placenta. *Endocrinology* 137, 817-824.
201. Levin, E.R., Gardner, D.G., and Samson, W.K. (1998). Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339, 321-328.
202. John, S.W., Krege, J.H., Oliver, P.M., Hagaman, J.R., Hodgin, J.B., Pang, S.C., Flynn, T.G., and Smithies, O. (1995). Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 267, 679-681.
203. Oliver, P.M., John, S.W., Purdy, K.E., Kim, R., Maeda, N., Goy, M.F., and Smithies, O. (1998). Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2547-2551.
204. Jankowski, M., Rachelska, G., Donghao, W., McCann, S.M., and Gutkowska, J. (2001). Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11765-11770.
205. Aydt, E.M., Wolff, G., and Morano, I. (2007). Molecular modeling of the myosin-S1(A1) isoform. *J Struct Biol* 159, 158-163.
206. Lossie, J., Ushakov, D.S., Ferenczi, M.A., Werner, S., Keller, S., Haase, H., and Morano, I. (2012). Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting. *Cardiovasc Res* 93, 390-396.
207. Auckland, L.M., Lambert, S.J., and Cummins, P. (1986). Cardiac myosin light and heavy chain isotypes in tetralogy of Fallot. *Cardiovasc Res* 20, 828-836.
208. Morano, I., Hadicke, K., Haase, H., Bohm, M., Erdmann, E., and Schaub, M.C. (1997). Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 29, 1177-1187.
209. Ritter, O., Luther, H.P., Haase, H., Baltas, L.G., Baumann, G., Schulte, H.D., and Morano, I. (1999). Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo

- with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)* 77, 677-685.
210. Schaub, M.C., Hefti, M.A., Zuellig, R.A., and Morano, I. (1998). Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res* 37, 381-404.
 211. Fewell, J.G., Hewett, T.E., Sanbe, A., Klevitsky, R., Hayes, E., Warshaw, D., Maughan, D., and Robbins, J. (1998). Functional significance of cardiac myosin essential light chain isoform switching in transgenic mice. *J Clin Invest* 101, 2630-2639.
 212. Morales, D.E., McGowan, K.A., Grant, D.S., Maheshwari, S., Bhartiya, D., Cid, M.C., Kleinman, H.K., and Schnaper, H.W. (1995). Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 91, 755-763.
 213. Morano, I. (1999). Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med (Berl)* 77, 544-555.
 214. Barletta, F., Wong, C.W., McNally, C., Komm, B.S., Katzenellenbogen, B., and Cheskis, B.J. (2004). Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc. *Mol Endocrinol* 18, 1096-1108.
 215. Vadlamudi, R.K., Manavathi, B., Balasenthil, S., Nair, S.S., Yang, Z., Sahin, A.A., and Kumar, R. (2005). Functional implications of altered subcellular localization of PELP1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 65, 7724-7732.
 216. Brann, D.W., Zhang, Q.G., Wang, R.M., Mahesh, V.B., and Vadlamudi, R.K. (2008). PELP1--a novel estrogen receptor-interacting protein. *Mol Cell Endocrinol* 290, 2-7.
 217. Takemura, G., and Fujiwara, H. (2004). Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 104, 1-16.
 218. Devanathan, S., Whitehead, T., Schweitzer, G.G., Fettig, N., Kovacs, A., Korach, K.S., Finck, B.N., and Shoghi, K.I. (2014). An animal model with a cardiomyocyte-specific deletion of estrogen receptor alpha: functional, metabolic, and differential network analysis. *PLoS One* 9, e101900.
 219. Kararigas, G., Nguyen, B.T., and Jarry, H. (2014). Estrogen modulates cardiac growth through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism in healthy ovariectomized mice. *Mol Cell Endocrinol* 382, 909-914.
 220. Westphal, C., Schubert, C., Prella, K., Penkalla, A., Fliegner, D., Petrov, G., and Regitz-Zagrosek, V. (2012). Effects of estrogen, an ERalpha agonist and raloxifene on pressure overload induced cardiac hypertrophy. *PLoS One* 7, e50802.
 221. Jesmin, S., Sakuma, I., Hattori, Y., and Kitabatake, A. (2002). In vivo estrogen manipulations on coronary capillary network and angiogenic molecule expression in middle-aged female rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1591-1597.
 222. Losordo, D.W., and Isner, J.M. (2001). Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 6-12.
 223. Miller, V.M., and Duckles, S.P. (2008). Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* 60, 210-241.
 224. Ardelt, A.A., McCullough, L.D., Korach, K.S., Wang, M.M., Munzenmaier, D.H., and Hurn, P.D. (2005). Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor-alpha in a rodent experimental stroke model. *Stroke* 36, 337-341.
 225. Brouchet, L., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., Bayard, F., and Arnal, J.F. (2001). Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation* 103, 423-428.
 226. Gagliardi, A., and Collins, D.C. (1993). Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. *Cancer Res* 53, 533-535.
 227. Johns, A., Freay, A.D., Fraser, W., Korach, K.S., and Rubanyi, G.M. (1996). Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 beta estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice. *Endocrinology* 137, 4511-4513.

228. Pare, G., Krust, A., Karas, R.H., Dupont, S., Aronovitz, M., Chambon, P., and Mendelsohn, M.E. (2002). Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* *90*, 1087-1092.
229. Zaitseva, M., Yue, D.S., Katzenellenbogen, J.A., Rogers, P.A., and Gargett, C.E. (2004). Estrogen receptor-alpha agonists promote angiogenesis in human myometrial microvascular endothelial cells. *J Soc Gynecol Investig* *11*, 529-535.
230. Cochain, C., Channon, K.M., and Silvestre, J.S. (2013). Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxid Redox Signal* *18*, 1100-1113.
231. Cui, Y. (2010). Impact of lymphatic vessels on the heart. *Thorac Cardiovasc Surg* *58*, 1-7.
232. Laine, G.A., and Allen, S.J. (1991). Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function. *Circ Res* *68*, 1713-1721.
233. Park, J.H., Yoon, J.Y., Ko, S.M., Jin, S.A., Kim, J.H., Cho, C.H., *et al.* (2011). Endothelial progenitor cell transplantation decreases lymphangiogenesis and adverse myocardial remodeling in a mouse model of acute myocardial infarction. *Exp Mol Med* *43*, 479-485.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Chef Prof. Dr. Ingo Morano, Leiter der Abteilung Molekulare Muskel Physiologie am MDC-Berlin, für all die vorbehaltlose Unterstützung und die uneingeschränkten wissenschaftlichen Freiräume, die er mir gegeben hat, sowie für die unzähligen konstruktiven Anregungen und Diskussionen, die meine wissenschaftlichen Laufbahn zweifellos sehr stark geprägt haben. Ich danke ihm insbesondere für die kontinuierliche Ermunterung und die Möglichkeit bei ihm habilitieren zu können.

Mein aufrichtiger und spezieller Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Vera Regitz-Zagrosek für die stete Unterstützung während der gesamten gemeinsamen Arbeit am Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM) und die vielen interessanten wissenschaftlichen Diskussionen und Ideen, die mich immer wieder herausgefordert, begeistert und nachhaltig geprägt haben. Ebenfalls verdanke ich ihr die grundsätzliche Sensibilisierung für das interessante Thema Geschlechterforschung in der Medizin.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Martin Meixner und PD Dr. Thomas Pickardt bedanken, die mich in den ersten Jahren meiner wissenschaftlichen Karriere tatkräftig begleitet haben. Ein gesonderter und sehr persönlicher Dank geht an Prof. Dr. Wolfgang Schuster, der für mich stets das Vorbild eines großartigen Wissenschaftlers mit Herz ist. Ihm danke ich herzlichst dafür, dass er mir eine große Stütze in schwierigen Zeiten war.

Mein ganz persönlicher und herzlicher Dank gilt Frau Dr. Elke Dworatzek für die tolle wissenschaftliche Zusammenarbeit und für die ganzen wunderbaren Jahre, in denen wir sehr viel Freude und Leid geteilt haben. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Stephan Fritschka, Hang Pham, Dr. Miriam Schanz, Dr. Joachim Leber, Dr. Xiang Zhang, Dr. Sarah Nordmeyer, Dr. Johannes Nordmeyer, Karolin Duft und Cindy Schriever sehr herzlich bedanken, die durch ihre Unterstützung und konstruktive Zusammenarbeit einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen der experimentellen Arbeiten geleistet haben.

Weiterhin zu Dank verpflichtet bin ich allen meinen Kollegen am CCR, insbesondere Arne Kuhne, Britta Fielitz, Jenny Thomas und Vanessa Riese, sowie meinen Kollegen am MDC Petra Domaing, Karin Karczewski, Manuela Kaada und Steffen Luther, ohne deren hochkompetente Mitarbeit diese Arbeit nicht optimal durchführbar gewesen wäre.

Aus persönlichen Gründen möchte ich mich sehr herzlich auch bei meiner Familie insbesondere bei meiner Mutter und meinen Schwestern, sowie bei allen meinen Freunden bedanken, die mir immer emotional beigestanden haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Andrés Ehmann bedanken, ohne dessen vielfältige Unterstützung diese Arbeit nie realisiert worden wäre und dessen aufmunternder Optimismus mir Kraft zum Durchhalten gab.

Last but not least möchte ich mich an dieser Stelle für die zur Durchführung der Projekte notwendige finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und die Friede-Springer-Herz-Stiftung sehr herzlich danken.

7. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

25.03.2017.....

Datum

.....

Unterschrift