

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

DISSERTATION

Die Effekte von Östrogen auf den Proteingehalt, die Lokalisation
und Funktion von Sirt1 in humanen Makrophagen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Breiter
aus Offenbach am Main

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Kurzzusammenfassung.....	9
Abstract	11
1 Einleitung.....	12
1.1. Geschlechterspezifische Aspekte der koronaren Herzkrankheit	12
1.2. Die Entstehung der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit.....	12
1.3. Die Rolle der Makrophagen im Entzündungsprozess	13
1.4. Östrogeneffekte bei kardiovaskulären und entzündlichen Erkrankungen.....	13
1.5. Östrogen und Östrogen-Rezeptoren	14
1.6. Sirtuine.....	15
1.7. Die Lokalisation und Funktion von Sirt1	16
1.8. Die Zielproteine und Effekte von Sirt1	16
1.9. Die Auswirkungen von Östrogen auf Sirt1	18
1.10. Ziele der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Laborgeräte.....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterial	22
2.1.3 Chemikalien, Medien und Lösungen	23
2.1.4 Zusammensetzung von Nährmedien und Pufferlösungen.....	25
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Zellkultur.....	33
2.2.2 FACS.....	36
2.2.3 Proteine.....	37

2.2.4	RNA-Isolation	38
2.2.5	Reverse Transkription	39
2.2.6	Isolation reiner intakter Kerne.....	40
2.2.7	Statistik.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Effekte der Aktivierung der Östrogen-Rezeptoren in humanen Makrophagen.....	42
3.1.1	Nachweis der Reinheit der Monozyten-Population bei der Isolation von primären humanen Monozyten.....	42
3.1.2	Nachweis der Polarisation von primären humanen Monozyten (M0) zu M1-Makrophagen mittels PCR	42
3.1.3	Morphologie von M1-Makrophagen.....	44
3.1.4	Nachweis der Östrogen-Rezeptoren ER α , ER β und GPR30 in primären humanen Makrophagen	45
3.1.5	Nachweis der erhöhten Phosphorylierung von ERK nach Behandlung mit E2. 45	
3.1.6	Effekte der ER-Aktivierung auf die Sirt1-Proteinmenge in M1-differenzierten primären humanen Makrophagen	46
3.1.7	Auswirkung der Aktivität von Sirt1 auf die Acetylierung von Lysinresten sowie die Protein-Deacetylierung der Sirt1-Zielproteine (Acp53, AcKu70).....	47
3.1.8	Einfluss der Behandlung mit E2 auf die Proteinmenge der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF κ B	51
3.1.9	Einfluss der Behandlung mit E2 auf den mRNA-Gehalt von Entzündungsmediatoren.....	52
3.2	Einfluss von E2 auf Sirt1 in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle.....	53
3.2.1	Nachweis der erhöhten Phosphorylierung von ERK nach Behandlung mit E2. 53	
3.2.2	Nachweis der Isolation von reinen intakten Kernen und der nukleusfreien Fraktion aus THP1-Zellen.....	54
3.2.3	Nachweis der Eignung des Protokolls zur Nukleusisolation zur Bestimmung der Acetylierungsänderung	54

3.2.4	Effekte der ER-Aktivierung auf den Sirt1-Proteingehalt in der nukleären und nukleusfreien Fraktion sowie im Vollzellysat von THP1-Makrophagen	56
3.2.5	Effekte der ER-Aktivierung auf die Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion und im Vollzellysat von THP1-Makrophagen	57
3.2.6	Effekte der ER-Aktivierung auf die Acetylierung von Ku70 in der nukleären Fraktion und im Vollzellysat von THP1-Makrophagen	59
4	Diskussion.....	61
4.1	Wichtigste Ergebnisse der Arbeit.....	61
4.2	Validierungsexperimente.....	61
4.3	Experimente zum Östrogen-Einfluss auf Sirt1 und dessen Zielproteine.....	62
4.4	Kompartimentabhängige Ausprägung der Menge des Proteins Sirt1 und von dessen Zielproteinen.....	65
4.5	Erkenntnisse der Arbeit	67
4.6	Limitationen und methodische Einschränkungen.....	69
4.7	Ausblick.....	69
4.8	Schlussfolgerung	71
5	Literaturverzeichnis	73
6	Anhang.....	89
6.1	Eidesstattliche Versicherung	89
6.2	Lebenslauf	90
6.3	Publikationen	91
6.4	Danksagung	92
6.5	Ponceau-Daten und Original Membranen	93

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APS	Ammonium Persulfat
Bax	Bcl-2-assoziiertes X-Protein
BMDM	<i>bone marrow derived macrophages</i> (Knochenmarksmakrophagen)
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Differenzierungscluster)
c-E2	Mit Cyclodextrin enkapsuliertes 17 β -Östradiol
COX-2	Cyclooxygenase 2
CS-FCS	<i>charcoal stripped fetal bovine serum</i>
DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
E2	17- β -Östradiol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verbesserte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	<i>Estrogen receptor</i> (Östrogenrezeptor)
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
hMCSF	humaner Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
IDCR	<i>Ionic Detergent Compatibility Reagent</i>
IFN γ	Interferon- γ
IGEPAL	Octylphenoxy Poly(ethyleneoxy)ethanol
IL	Interleukin

LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M0	M0-Monozyten
M1	M1-Makrophagen
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i> (Magnetisch aktivierte Zellsortierung)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinasen</i>
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAA	Polyacrylamid
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (mononukleäre Zellen)
PBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RBC	<i>Red Blood Cell</i> (Rote Blutzelle)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institut
RU	<i>Relative Units</i> (Relative Einheiten)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sirt	<i>silent mating type information regulation 2 homolog</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aktueller Stand der Forschung im Tiermodell (Nagermodell) und in humanen Brustkrebs-Zelllinien.....	19
Abbildung 2. FACS-Analyse von primären humanen Monozyten mit CD45-VioBlue und CD14-APC-Vio 770 Antikörper.	42
Abbildung 3. Nachweis der M1-Polarisation in weiblichen primären humanen M1-Makrophagen.....	43
Abbildung 4. Nachweis der M1-Polarisation in männlichen primären humanen M1-Makrophagen.....	43
Abbildung 5. Morphologie von männlichen M1-Makrophagen nach 4 h Behandlung mit LPS und IFN- γ für die M1-Polarisation.....	44
Abbildung 6. Nachweis der Östrogenrezeptoren ER α , ER β und GPR30 in weiblichen und männlichen primären humanen M1-Makrophagen.	45
Abbildung 7. ERK-Phosphorylierung in humanen primären männlichen und weiblichen M1-Makrophagen nach 24-stündiger Stimulation mit E2	46
Abbildung 8. Sirt1-Proteinmenge in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen.....	47
Abbildung 9. Proteinmenge von AcLysin in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen.....	48
Abbildung 10. Einfluss einer Behandlung mit E2 auf die Acetylierung von p53 in primären humanen weiblichen und männlichen M1-Makrophagen	49
Abbildung 11. Einfluss einer Behandlung mit E2 auf die Acetylierung von Ku70 in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen	50
Abbildung 12. Proteinmenge von NF κ B-p65 in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen.....	51
Abbildung 13. Einfluss der Behandlung mit E2 auf den mRNA-Spiegel von Entzündungsmediatoren in weiblichen und männlichen primären humanen M1-Makrophagen	52
Abbildung 14. ERK-Proteingehalt und -Aktivität in M0- und M1-polarisierten THP1-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit E2.....	53
Abbildung 15. Proteinmenge in THP1-Zellen nach Isolation von reinen intakten Kernen und der nukleusfreien Fraktion.....	54

Abbildung 16. Proteinmenge in THP1-Zellen nach Isolation von reinen intakten Kernen und der nukleusfreien Fraktion.....	55
Abbildung 17. Sirt1-Proteingehalt in THP1-Makrophagen	57
Abbildung 18. Acetylierung von Lysin in THP1-Makrophagen	59
Abbildung 19. Acetylierung von Ku70 in THP1-Makrophagen.....	60
Abbildung 20. Grafische Zusammenfassung der Erkenntnisse der Arbeit	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Laborgeräte	21
Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 3. Übersicht der verwendeten Chemikalien Medien und Lösungen.....	23
Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Chemikalien Medien und Lösungen.....	25
Tabelle 5. FACS	31
Tabelle 6. Antikörper.....	31
Tabelle 7. RNA-Primer.....	31
Tabelle 8. Software.....	32

Kurzzusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar. Die Rolle des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen (E2) bei kardiovaskulären Erkrankungen wird in zahlreichen Studien kontrovers diskutiert. Die möglichen protektiven Effekte von E2 bei der Entwicklung der Atherosklerose sind unter anderem zurückzuführen auf die Wirkung von E2 auf Chemokine und Zytokine, welche am frühentzündlichen Prozess der Atherosklerose beteiligt sind. Eine wichtige Rolle im Rahmen dieser entzündlichen Prozesse spielen die mononukleären Abwehrzellen Makrophagen.

Ein potentielles Zielprotein für Östrogen ist die NAD⁺-abhängige Deacetylase Sirt1. Es wurde postuliert, dass ihre Aktivität durch die Östrogen-Rezeptor-Subtypen alpha and beta moduliert wird. Eine Aktivitätszunahme von Sirt1 führt im Nukleus zur Deacetylierung der Proteine p53, Ku70 und NFκB. Die Effekte von E2 auf die Proteinmenge und Funktion von Sirt1 in humanen Zellen sind bisher wenig erforscht. Daten über die E2-Sirt1-Interaktion in humanen Zellen wurden hauptsächlich in pathologischen Zellen akquiriert, bspw. in Brustkrebs-Zelllinien.

In dem vorliegenden Projekt sollte untersucht werden, ob E2 einen Einfluss auf den Sirt1-Gehalt und die Sirt1-Aktivität in humanen Makrophagen hat, gemessen anhand des Acetylierungsgrades der nukleären Proteine p53 und Ku70. Weiterhin sollte der Effekt von E2 auf die Lokalisation von Sirt1 in der humanen Makrophagen-Zelllinie THP1 untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit E2 keinen Effekt auf den Proteingehalt von Sirt1 im Vollzelllysat von primären humanen M1-Makrophagen hat, wohingegen die Acetylierung der nukleären Proteine p53 in weiblichen sowie Ku70 in weiblichen und männlichen M1-Makrophagen erhöht ist. Die Menge des zytosolischen Sirt1-Zielproteins NFκB-p65 zeigt sich in männlichen M1-Makrophagen unter Stimulation mit E2 erhöht, während in weiblichen M1-Makrophagen kein E2-Effekt nachweisbar ist. Um die Effekte von E2 in den einzelnen Zellkomponenten genauer zu eruieren, erfolgte eine Nukleusisolation mit der humanen monozytären Zelllinie THP1, da eine Isolation der nukleären Fraktion in primären humanen Zellen nicht möglich war.

In THP1-Zellen zeigte sich unter Stimulation mit E2 ein signifikanter Abfall des Sirt1-Gehaltes in der nukleären Fraktion sowie eine signifikante Steigerung der Ku70-Acetylierung, wohingegen die Sirt1-Menge und Ku70-Acetylierung im Vollzelllysat unverändert blieb.

Zusammenfassung: Die Ergebnisse der Versuche führten zu der Hypothese, dass die vermehrte Acetylierung der nukleären Proteine p53 und Ku70 bei unveränderter Sirt1-Proteinmenge im Vollzellslysate auf einen verminderten nukleären Sirt1-Gehalt zurückzuführen ist.

Abstract

Cardiovascular diseases severely contribute to death and disability worldwide, with the male sex as a major risk factor. The role of the female sex hormone estrogen (E2) in cardiovascular diseases has been discussed controversially in several studies. The potential protective effects of estrogen in the development of atherosclerosis is, amongst others, due to the effect of E2 on chemokines and cytokines, which are involved in the early-inflammatory process of atherosclerosis. The mononuclear immune cell macrophages figure prominently in the inflammatory process.

One potential target protein of E2 is the NAD⁺-dependent deacetylase Sirt1, its amount seems to be modulated by the estrogen receptor subtypes alpha and beta. An increased activity of Sirt1 leads to deacetylation of the proteins p53, Ku70 and NFκB in the nucleus. The effects of E2 on protein levels and function of Sirt1 in human cells have been poorly investigated. Data on E2-Sirt1 interaction in human cells have mainly been acquired in pathological cells, e.g., breast cancer cell lines.

This study attempted to show the effects of E2 on the amount and activity of Sirt1 in human macrophages, measured by the level of acetylation of the nuclear proteins p53 and Ku70. Furthermore, the effects of E2 on the localization of Sirt1 were investigated in the human monocytic cell line THP1.

A stimulation with E2 in primary human macrophages showed no effects on the protein amount of Sirt1 in full cell lysate, whereas the nuclear proteins p53 in female and Ku70 in female and male macrophages showed an increase of acetylation. The amount of the cytosolic Sirt1-target-protein NFκB-p65 was increased in male macrophages during stimulation with E2, whereas no effect could be seen in female macrophages. To investigate the effects of E2 in the individual cell components in more detail, nucleus isolation was performed using the human monocytic cell line THP1, since isolation of the nuclear fraction in primary human cells was not possible.

In THP1-cells with E2 stimulation, a significant decrease of Sirt1 amount was detected in the nuclear fraction as well as an increase of Ku70-acetylation. In contrast, the Sirt1 amount in the full cell lysate remained unchanged.

Conclusion: The results of the experiments led to the hypothesis that the increased acetylation of nuclear proteins p53 and Ku70 with unchanged Sirt1 protein levels in whole cell lysate was due to decreased nuclear Sirt1 levels.

1 Einleitung

1.1. Geschlechterspezifische Aspekte der koronaren Herzkrankheit

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar, wobei das männliche Geschlecht eine höhere Prävalenz insbesondere bei der koronaren Herzkrankheit im jüngeren Alter aufweist.^{1,2} Bei den Hauptrisikofaktoren der koronaren Herzkrankheit spielt das Geschlecht eine wichtige Rolle. Studien konnten zeigen, dass Diabetes mellitus und Bluthochdruck vor allem bei Frauen zu einem erhöhten Risiko führen, während erhöhte Lipide und abdominelle Adipositas bei beiden Geschlechtern ein ähnliches Risikoprofil aufweisen.³⁻⁶ Auch bei Frauen gehören kardiovaskuläre Erkrankungen zu den Haupttodesursachen, allerdings manifestieren sich diese bei ihnen meist erst in höherem Lebensalter. Eine der Ursachen für diese zeitliche Verzögerung könnte eine mögliche protektive Funktion des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen (E2) sein.⁷ Neben vielen anderen durch das Geschlechter hervorgerufenen Unterschieden im kardiovaskulären System wurden signifikante Unterschiede bei entzündlichen Mechanismen im Prozess der Atheroskleroseentstehung gezeigt, die am ehesten zurückzuführen sind auf die Wirkung von E2 auf Chemokine und Zytokine.^{8,9}

1.2. Die Entstehung der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit

Die Atherosklerose entsteht durch einen mehrstufigen, chronischen Entzündungsprozess der Gefäßwand. Im Laufe des Lebens kommt es zu einer Anhäufung von Lipiden und fibrotischen Elementen in den Wänden großer Arterien.¹⁰ Im Prozess der chronischen Inflammation interagieren diese in die Gefäßwand eingelagerten oxidativ modifizierten Lipoproteine mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen und einer Vielzahl von modulierenden Zytokinen und Mediatoren.^{11, 12}

Der Prozess der Entstehung eines atherosklerotischen Plaques lässt sich in mehrere Stadien einteilen. Initial kommt es zu einer Endothelschädigung mit morphologischen und funktionellen Änderungen des Endothels.¹³ Durch diese endotheliale Dysfunktion werden Endothelzellen zur Expression einer Vielzahl von Chemokinen angeregt. Diese begünstigen die Transmigration von Monozyten und T-Lymphozyten in den subintimalen Raum. Durch den Wachstumsfaktor Macrophage-Colony Stimulation Factor (M-CSF) wird die Umwandlung der Monozyten in Makrophagen angeregt.¹² Durch die Freisetzung von entzündungsfördernden Mediatoren wird die entzündliche Reaktion in dem entstehenden Plaque aufrechterhalten und

gefördert.¹⁴ Lagern sich diese Plaques in der Gefäßwand der Herzkranzgefäße ab, entsteht die koronare Herzkrankheit (KHK).

1.3. Die Rolle der Makrophagen im Entzündungsprozess

Makrophagen spielen eine bedeutende Rolle bei der unspezifischen Abwehr von Krankheitserregern und sind Teil des mononukleären phagozytären Systems. Sie entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark, zirkulieren als Monozyten im Blut und migrieren schließlich in die unterschiedlichen Gewebe des Körpers, wo sie zu Makrophagen transformieren. Sämtliche Makrophagen besitzen auf ihrer Oberfläche das Zelladhäsionsmolekül CD68 (Differenzierungscluster 68) als Bestandteil ihrer intrazellulären lysosomalen Membranproteine.¹⁵ Das für Monozyten charakteristische Antigen CD14 hingegen geht während des Reifungsprozesses verloren.¹⁶ Eine effiziente Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen ist essentiell für den Entzündungsprozess.

Vielfältige Stressoren führen zur Aktivierung von Makrophagen, der resultierende Differenzierungstyp hängt hierbei von der Art des entzündlichen Stimulus ab. Unstimulierte M0-Monozyten differenzieren sich durch Zugabe von Interferon γ (IFN- γ), Lipopolysaccharid (LPS) oder Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF) zu den klassisch aktivierten M1-Makrophagen.¹⁷ M1-Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische Mediatoren wie zum Beispiel Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) sowie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies, die eine effektive Methode zur Abtötung von Pathogenen darstellen.

Auch diese molekularen Mechanismen des Entzündungsprozesses werden durch das Geschlecht beeinflusst, wobei das Geschlechtshormon Östrogen eine zentrale Rolle einnimmt.

1.4. Östrogeneffekte bei kardiovaskulären und entzündlichen Erkrankungen

Das weibliche Geschlechtshormon Östrogen (E2) ist beteiligt an der Regulation von entzündlichen Erkrankungen, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen größtenteils unbekannt sind. Nach der Menopause entwickeln Frauen vermehrt kardiovaskuläre Erkrankungen, was u.a. auf einen Verlust antiatherosklerotischer bzw. antiinflammatorischer Effekte von E2 zurückgeführt wird.¹⁸⁻²⁰ Nicht-humane postmenopausale weibliche Primaten sowie Frauen mit postmenopausalem Östrogenmangel und Männer mit einem Östrogenrezeptor-Defekt entwickeln eine frühzeitige Atherosklerose²¹⁻²³ – ein Effekt, der in

einzelnen Studien durch die Gabe von E2-haltigen oralen Kontrazeptiva verhindert werden konnte.^{24,25}

Die protektiven Effekte von E2 bei der Entwicklung der Atherosklerose sind unter anderem zurückzuführen auf die Wirkung von E2 auf Chemokine und Zytokine, welche am frühentzündlichen Prozess der Atherosklerose beteiligt sind.^{20,26} Dies wirkt sich auch positiv auf die Stabilität des Endothels aus.¹⁹

Sexualhormone modulieren das Immunsystem durch Hormonrezeptoren und regulieren den Entzündungsprozess.²⁷ Sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte von E2 wurden beschrieben²⁸, mehrheitlich jedoch werden die anti-inflammatorischen Effekte von E2 beschrieben²⁹ Ein Verlust von E2 führt zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine in menschlichen Zellen.³⁰

In aktivierten humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) inhibiert E2 die Expression pro-inflammatorischer Zytokine.³¹ E2 übt seine anti-entzündlichen Effekte auf Makrophagen hauptsächlich durch eine Inhibition von Lipopolysaccharid-induzierten Genprodukten wie TNF- α , IL-1 und IL-6 über eine Herunterregulierung des NF κ B-Signalweges aus.³² Des Weiteren reduziert E2 die Phosphorylierung von p38 im Myokard und die Expression von pro-entzündlichen Mediatoren, bspw. TNF- α , IL-1 β und IL-6, die nach Myokardischämie und Reperfusion in weiblichen Nagetieren absinken.³³ Allerdings ist auch beschrieben, dass E2 auch pro-entzündliche Wirkungen in einigen chronisch-entzündlichen Erkrankungen haben könnte.^{33,34} Studien von Cutolo et al. beispielsweise konnten eine erhöhte Menge an Markern für Zellwachstum und -proliferation nachweisen.³⁵

1.5. Östrogen und Östrogen-Rezeptoren

Östrogene sind Steroidhormone, die eine essentielle Rolle bei der Ausprägung der charakteristischen weiblichen Geschlechtsmerkmale spielen. Sie werden bei weiblichen Individuen in den Theka- und Granulosa-Zellen der Ovarien synthetisiert. In männlichen Individuen entstehen sie, neben einer geringen endogenen Produktion in den Leydigzellen des Hodens, hauptsächlich durch die Umwandlung von Testosteron in Östradiol durch das Enzym Aromatase. Die wichtigsten endogenen Östrogene sind Östron (E1), Östradiol (E2 oder 17 β -Estradiol), Östriol (E3).^{36,37}

Bisher wurden drei Rezeptorsubtypen identifiziert: ein membrangebundener G-Proteingekoppelter Östrogen-Rezeptor (GPER, GPR30)³⁸ und zwei genomische Rezeptoren, der Östrogen-Rezeptor alpha (ER α) und der Östrogen-Rezeptor beta (ER β).³⁹

Über den genomischen Signalweg kann Östrogen direkt die Gentranskription beeinflussen.⁴⁰ Lipophile Steroidhormone können durch Zellmembranen hindurch diffundieren und an intrazelluläre, cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren binden.⁴¹

Die Reaktionskaskade des nicht-genomischen Signalweges erfolgt durch die Bindung an intrazelluläre Östrogenrezeptoren. Über die Bildung von intrazellulären Second-Messenger-Proteinen und die Veränderung der Aktivität von Mitogen-Activated Protein Kinasen (MAPK) werden schnelle Effekte auf die Signaltransduktion und Genexpression erzielt.⁴² Eine besondere Rolle in diesem Prozess nimmt die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) ein, welche einen großen Einfluss auf die zelluläre Proliferation und Differenzierung hat.⁴³

Die Verteilung der Östrogenrezeptoren unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Geweben erheblich, beispielsweise ist ER α vorwiegend exprimiert in Uterus und Niere, während ER β in Prostata, Ovarien und Blase zu finden ist.^{36,44,45} Auch in vielen kardiovaskulären Zellen und Immunzellen kommen die Östrogen-Rezeptoren alpha und beta vor, wie beispielsweise Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen oder dendritischen Zellen.^{46,47} Östrogen reguliert zudem die Expression und Funktion vieler Enzyme, zu denen unter anderem die NAD⁺-abhängige Deacetylase Sirtuin 1 gehört.

1.6. Sirtuine

Sirtuine sind eine Klasse von evolutionär hoch konservierten Proteinen. Der Name *Sirtuin* leitet sich ab von der Histondeacetylase Sir2 (*silent mating-type information regulation 2*) aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren Reaktionsmechanismus von dem Cofaktor Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) abhängig ist. In Säugetieren gibt es sieben Sirtuine, Sirt1 bis Sirt7.⁴⁸ Sie haben ein breites Funktionsspektrum und sind in vielen Zellkompartimenten lokalisiert: Sirt1, -6 und -7 nukleär, Sirt3, -4 und -5 mitochondrial und Sirt1 und -2 zytosolisch.⁴⁹

Sirtuine besitzen zwei Katalysemechanismen: die NAD⁺-abhängige Deacetylase-Aktivität und die Mono-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität. Die vielfältigen Funktionen der Sirtuine reichen von der Kontrolle des Zellzyklus und Apoptose über das Gen-Silencing bis hin zur Energiehomöostase.⁵⁰

1.7. Die Lokalisation und Funktion von Sirt1

Das am umfassendsten untersuchte Sirtuin in Säugetieren ist die NAD⁺-abhängige Deacetylase Sirt1. Sirt1 ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, kommt aber auch zytosolisch vor.⁵¹⁻⁵³ Neben zwei Kernlokalisationssequenz-Domänen besteht Sirt1 auch aus zwei Domänen mit nukleärem Exportsignal, über die es zwischen dem Nukleus und dem Zytosol transferiert werden kann.⁵⁴

Sirt1 deacetyliert unterschiedliche Zielproteine, zu denen neben den Histonen auch Nicht-Histon-Proteine wie der Transkriptionsfaktor p53 gehören, und kann somit Einfluss auf diverse Stoffwechselprozesse nehmen. Zahlreiche Studien legen nahe, dass Sirt1 eine protektive Funktion im kardiovaskulären System innehaben könnte: So soll sich Sirt1 u.a. auf die Widerstandsfähigkeit von Endothel und Herz gegen Stressoren während des Alterungsprozesses positiv auswirken.^{55,56} In Endothelzellen reguliert Sirt1 die endotheliale Homöostase und die vaskuläre Funktion durch eine erhöhte NO-Produktion über die Deacetylierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).⁵⁷ Außerdem trägt Sirt1 zur Reduktion des vaskulären Stresses bei, indem es beispielsweise die RelA/p65-Untereinheit des NF- κ B deacetyliert, den TNF- α -Spiegel im Blut senkt und somit die charakteristische entzündliche Kaskade nach oxidativem Stress mildert.^{58,59}

1.8. Die Zielproteine und Effekte von Sirt1

Sirt1 interagiert direkt mit Transkriptionsfaktoren und Coregulatoren und kann deren Aktivität regulieren.^{60,61} Zu den am besten dokumentierten Sirt1-Zielproteinen gehören: das nukleäre Phosphoprotein p53, das DNA-Reparaturprotein Ku70 und der Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*).⁶²⁻⁶⁵

Das nukleäre Phosphoprotein p53 hat die Funktion eines Tumorsuppressors. Es ist in der Lage, den Zellzyklus zu blockieren und gibt so der Zelle die Möglichkeit, entstandene Schäden in der DNA zu reparieren.⁶⁶ Bei unzureichender Reparatur wirkt p53 als ein Aktivator der Transkription pro-apoptotischer Zielgene, beispielsweise Bax (Bcl-2-assoziiertes X-Protein) und leitet somit den programmierten Zelltod ein.^{64,65} Es übt seine tumorsuppressiven Effekte über seine Funktion als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor aus.⁶⁷ Posttranslational kann p53 in unterschiedlicher Weise modifiziert werden, beispielsweise über eine Phosphorylierung oder über eine Acetylierung durch Histon-Acetyltransferasen an den zahlreichen Lysinresten des p53.^{67,68} Durch die Acetylierung des p53 wird dessen Stabilität gefördert, was eine Ubiquitinierung und eine anschließende

Degradation des Proteins verhindert. Zusätzlich wird durch den Acetylierungsprozess die Chromatinstruktur aufgelockert, was das Ablesen der Erbinformation erleichtert.⁶⁹ P53 wird durch die Histondeacetylasen HDAC1 und die Klasse III HDAC Sirt1 deacetyliert und inaktiviert.^{70,71} Durch eine Deacetylierung aller relevanten p53-Acetylierungsstellen kann die p53-abhängige Apoptose inhibiert werden.^{72, 73}

Ein weiteres Zielprotein von Sirt1 ist das DNA-Reparaturprotein Ku70. Ku70 ist ein Bestandteil des heterodimeren Proteinkomplexes Ku70/Ku80. Der Komplex beteiligt sich an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA, in dem er an die freien Enden der durchtrennten DNA bindet und sie durch nicht-homologe Endverknüpfung neu aneinanderfügt.

Sirt1 ist in der Lage, Ku70 zu deacetylieren, indem es einen Komplex mit diesem bildet.⁶³ Eine Deacetylierung von Ku70 führt zu einer Blockade der Konformationsänderung von Bax und verhindert dessen Translokation ins Mitochondrium.⁷⁴ Durch eine Überexprimierung von deacetyliertem Ku70 wird die durch Bax vermittelte Apoptose unterdrückt und die Zelle somit vor dem programmierten Zelltod geschützt.⁷⁵

Ein weiteres, gut dokumentiertes Zielprotein ist der Transkriptionsfaktor NFκB, der eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielt. NFκB ist ein Dimer aus zwei verschiedenen Untereinheiten wie beispielsweise die Untereinheit p50 und die Untereinheit RelA/p65.⁷⁶ In inaktiver Form liegt NFκB an das Inhibitorprotein IκB im Zytoplasma gebunden vor. Das an den Transkriptionsfaktor gebundene IκB wird durch einen Komplex aus Kinasen phosphoryliert und löst sich vom p50/p65-Komplex ab.⁷⁷ Der aktivierte Transkriptionsfaktor gelangt in den Zellkern und aktiviert die Transkription nachfolgender Gene.^{64,65}

Sirt1 wirkt anti-apoptotisch durch seinen inhibitorischen Effekt auf NFκB und die direkte Deacetylierung von β-Catenin.⁷⁸ Die Deacetylierung von Lys310 in der Untereinheit RelA/p65 des NFκB-Komplexes führt zur Inhibition der transaktionalen Kapazität und treibt dessen Ubiquitinierung und Abbau voran.^{58,79} Eine Sirt1-Inaktivierung hingegen führt zur vermehrten Aktivierung des NFκB-Signalweges.⁸⁰ Entzündliche Mediatoren wie Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Interleukin-6 werden durch NFκB verstärkt transkribiert.⁸¹ Auch das Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1) ist ein gut bekanntes Zielprotein von NFκB.^{82,83}

In Proteom-Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Acetylierung von Lysin-Resten eine weit verbreitete und wichtige Form der posttranslationalen Proteinmodifikation ist, die sich auf eine Vielzahl von Proteinen auswirkt, die an der Kontrolle von Zellzyklus und Stoffwechsel, Langlebigkeit, Aktinpolymerisation und Kerntransport beteiligt sind.^{84,85}

Neben seiner Rolle im Signalweg der Immunzellen hat Sirt1 auch eine hervorzuhebende Bedeutung in den Zielzellen, beispielsweise Zellen, die durch die Entzündungsreaktion gefährdet werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Sirt1-Aktivierung einen anti-inflammatorischen Effekt durch eine Senkung der Sekretion von TNF- α aus Makrophagen hat. Ein Sirt1-Knockout hingegen führt zu einer Steigerung entzündlicher Signalwege in Makrophagen.⁸⁶

1.9. Die Auswirkungen von Östrogen auf Sirt1

Sirt1 ist ein potentielles Zielprotein für Östrogen. Seine Menge wird durch die Östrogen-Rezeptoren-Subtypen alpha und beta unterschiedlich moduliert.⁸⁷⁻⁹⁰

Studien legen nahe, dass eine direkte Interaktion zwischen ER α und dem Sirt1-Promoter besteht.⁹¹⁻⁹³ ER α induziert den Sirt1-Gehalt durch eine direkte Bindung an den Sirt1-Promotor. Darüber hinaus scheint die Bindung von ER α an den p53-Promotor Sirt1-abhängig zu sein, wie Elangovan et al nachweisen können: Eine Behandlung mit E2 führt nur in Anwesenheit von Sirt1 zur Suppression der p53-Transkription, wobei der E2-ER α -Sirt1-Promotor-Komplex als Suppressor des p53-Gens fungiert. Des Weiteren resultierte eine Behandlung mit E2 in einer Deacetylierung des p53 – ein Effekt, welcher durch einen Knockdown von Sirt1 aufgehoben werden konnte.⁹¹ Sirt1 scheint somit in Brustkrebszellen das Tumorwachstum durch Hemmung der Tumorsuppressorfunktion des p53 zu beschleunigen.

Aus Tiermodellen ist bekannt, dass eine Interaktion zwischen ER α und Sirt1 besteht.⁹¹ E2 erhöht im Mausmodell die Menge von Sirt1⁹⁴ und die seiner Zielproteine.^{62-65,94}

Die Effekte von E2 auf die Proteinmenge und Funktion von Sirt1 in humanen Zellen sind bisher wenig erforscht. Daten über die E2-Sirt1-Interaktion in humanen Zellen wurden hauptsächlich in pathologischen Zellen aquiriert, bspw. in Brustkrebs-Zelllinien.^{90,91} In gesunden humanen Zellen wurden die Interaktionen zwischen E2 und Sirt1 bisher noch unzureichend untersucht. Dies ist Gegenstand dieser Arbeit.

Da Makrophagen bei den Entzündungsvorgängen im Rahmen der Atheroskleroseentstehung eine essentielle Rolle einnehmen, soll die Interaktion von Östrogen und Sirt1 exemplarisch an diesem Zelltyp erforscht werden.

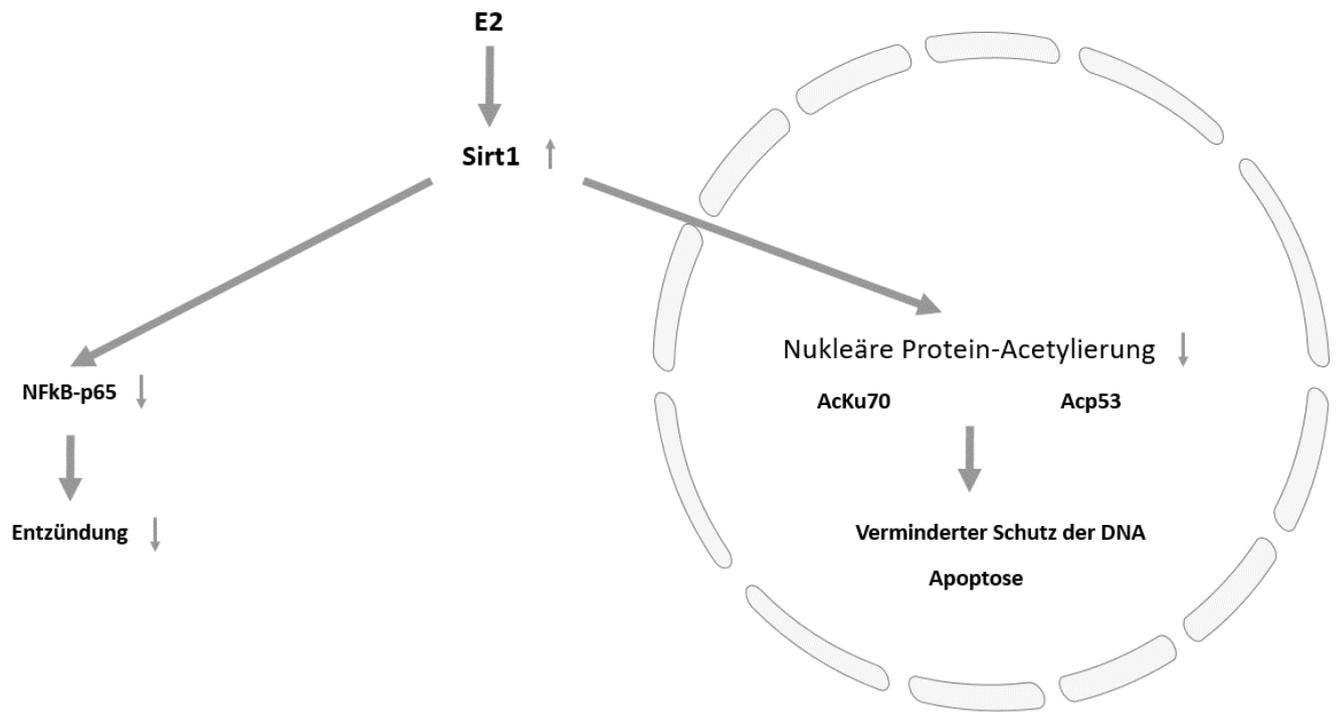


Abbildung 1. Aktueller Stand der Forschung im Tiermodell (Nagermodell) und in humanen Brustkrebs-Zelllinien.

E2 erhöht die Aktivität von Sirt1 und sorgt für die Deacetylierung der Sirt1-Zielproteine.^{95,96}

Eine Zunahme der Aktivität der NAD⁺-abhängigen Deacetylase Sirt1 führt zu einer verstärkten Deacetylierung nukleärer Proteine wie Acp53 und AcKu70.^{97,98} Eine verminderte Acetylierung von nukleären Proteinen schützt die DNA und führt zu einer Senkung der Apoptoserate.^{99,100}

Weiterhin führt eine Erhöhung der Sirt1-Aktivität zu einer Senkung der Menge der p65-Untereinheit des NFκB-Komplexes, da Sirt1 NFκB-p65 deacetyliert und somit für dessen Abbau sorgt.¹⁰¹

Legende:

E2 = 17-β-Estradiol

↑ = erhöhte Proteinmenge

↓ = verminderte Proteinmenge

1.10. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Einfluss von E2 auf den **Sirt1-Proteingehalt, die Funktion und Lokalisation in humanen Makrophagen** untersucht werden.

Hierzu sollen

Erstens, die Auswirkungen einer ER-Aktivierung auf die Sirt1-Proteinmenge in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten ermittelt werden.

Zweitens, die Wirkung von E2 auf die Sirt1-Aktivität analysiert werden, gemessen anhand des Acetylierungsgrades von nukleären Proteinen (p53, Ku70), der Acetylierung von Lysinresten und der Proteinmenge der p65-Untereinheit des NFκB-Komplexes.

Drittens, der Einfluss einer Behandlung mit E2 auf den mRNA-Transkriptionslevel von Sirt1-abhängigen Entzündungsmediatoren in humanen Makrophagen untersucht werden.

Viertens, der Effekt von E2 auf die Lokalisation von Sirt1 und die Acetylierung der Sirt1-Zielproteinen in humanen Makrophagen analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die wesentlichen Materialien, die zur Durchführung der Experimente dieser Arbeit notwendig waren, aufgelistet.

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Hersteller
ChemiDoc MP Bildgebungssystem	BioRad (München)
Digitalkamera DMC-LX7	Panasonic (USA)
Edelstahlbehälter für Flüssigstickstoff	KGW-Isotherm (Karlsruhe)
Elektrische Pipettenpumpe Pipettus	Hirschmann Labor Geräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Elektrischer Timer	Roth (Karlsruhe)
Gefrierbehälter	Thermo Scientific (Langenselbold)
Inkubator BBD 6220	Heraeus (Hanau)
Kipp-Laborschüttler	Biometra (Göttingen)
Kühlschrank 4°C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
Laborwaage 2001 MP2	Sartorius (Göttingen)
Laborwaage ALT 220-5DAM	Kern (Hamburg)
MACSQuant	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Magnetmixer KMO 2 basic	IKA Werke GmbH (Staufen)
Mechanischer Handzähler	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Göttingen)
Mikroskop Leica DMIRE2	Leica (Essen)
Mikrotiterplatten-Spektrophotometer xMark	Bio-Rad (München)
Multipipette	Eppendorf (Hamburg)
Multiwave Photometer	Thermo Scientific (Langenselbold)
NanoDrop ND-100 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Neubauer Zählkammer	Roth (Karlsruhe)

PCR-Maschine	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter FiveEasy	Mettler Toledo (USA)
Pipettiergerät (1-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Rack neo lab 1969	NeoLab (Heidelberg)
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Werke GmbH (Staufen)
StepOne Real-Time PCR-System	Life Technologies (Darmstadt)
Sterilbank	Hera Safe Heraeus Instruments (Hanau)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr (Ochsenhausen)
Tiefkühlschrank -80°C	Sanyo (München)
Vacubay Absaughilfe	Integra (Berlin)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
Zentrifuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge 22R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5430R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
8-PCR-Tube-Streifen	Kisker Biotech (Steinfurt)
96-Well PCR-Platte <i>fast type</i>	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Adhäsive transparente PCR-Folie	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
BD Vacutainer Safety-Lok Blutentnahme-Set	BD Biosciences (USA)
Hybond ECL Nitrozellulose	VWR (Darmstadt)
Kimtech Science Wischtücher	Roth (Karlsruhe)
Kryoröhrchen 1,2 ml	Corning (USA)
MACS-Separationssäulen	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)

MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Platten	Life Technologies (Darmstadt)
Mikroskop-Objektträger, Deckgläschen	Roth (Karlsruhe)
Parafilm	Bemis Company (USA)
Pasteur-Pipetten aus Glas 230 mm	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipette (5, 10, 25, 50 ml)	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen (25, 75, 125)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte (6-, 12-Well)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschale 100, Standard	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber Cell Lifter	Corning (USA)
Zentrifugenröhre (15, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

2.1.3 Chemikalien, Medien und Lösungen

Tabelle 3. Übersicht der verwendeten Chemikalien Medien und Lösungen

Produkt	Hersteller
17β-Östradiol (Cyclodextrin-encapsuliert)	Sigma Aldrich (Steinheim)
2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin	Sigma Aldrich (Steinheim)
2x Power SYBR Green PCR Master-Mix	Life Technologies (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat	Roth (Karlsruhe)
Bovine Albuminfraktion V	Roth (Karlsruhe)
Bovines Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid-Tetrahydrat	Merck (Darmstadt)
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
ROTI® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
D-(+) Glucose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Destilliertes Zellkulturwasser	Gibco (USA)
Diethylpyrocarbonat-Wasser	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i> ohne Phenolrot	Gibco (USA)
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)</i>	Gibco (USA)
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)</i> , kein Calcium, kein Magnesium	Life Technologies (Darmstadt)
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)</i>	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Ethanol 100 %, <i>Baker analysed</i>	Merck (Darmstadt)
Ethanol 70 %	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Versen)	Merck (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG (Berlin)
Fetales Kälberserum, mit Aktivkohle behandelt (<i>Charcoal-stripped FCS</i>)	Pan Biotech (USA)
<i>Ficoll-Paque</i>	VWR (Darmstadt)
Flüssigstickstoff	Linde (München)
Human Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Humanes IFN- γ	Peptotech (Hamburg)
Humanes M-CSF	Peptotech (Hamburg)
IGEPAL CA-630	Sigma Aldrich (Steinheim)
<i>Ionic Detergent Compatibility Reagent (IDCR)</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Lipopolysaccharid (LPS)	Peptotech (Hamburg)
Luminol	Sigma Aldrich (Steinheim)
MACSQuant Laufpuffer	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Milchpulver Blotting-Grade	Roth (Karlsruhe)
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid	Sigma Aldrich (Steinheim)
Natriumphosphat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Paraformaldehyde	Merck Millipore (Darmstadt)
p-Cumarsäure	Sigma Aldrich (Steinheim)
Penicillin / Streptomycin Lösung (P/S)	Biochrom (Berlin)
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (Steinheim)

<i>Pierce 660 nm Protein Assay Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
<i>Pierce BCA™ Proteinbestimmungs-Set</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Ponceaurot	Sigma Aldrich (Steinheim)
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) , P2714	Sigma Aldrich (Steinheim)
<i>Protein Prestained Page Ruler</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
RNA-Bee	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
RPMI-1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute, mit und ohne Phenolrot)	Gibco (USA)
Salzsäure 37% Rotipuran	Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma Aldrich (Steinheim)
Trizol®-Reagenz	Life Technologies (Darmstadt)
Trypanblau	Gibco (USA)
Trypsin/EDTA ohne Phenolrot	Sigma Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich (Steinheim)

2.1.4 Zusammensetzung von Nährmedien und Pufferlösungen

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Chemikalien Medien und Lösungen

Millipore-Wasser wurde zur Zubereitung aller Nährmedien und Pufferlösungen genutzt.

Tabelle 4.1 TRIS buffered saline (TBS) (10x), pH 7.6

TRIS Base	40 mmol
NaCl	1,36 mol

Tabelle 4.2 TRIS buffered saline (TBS), pH 8,8. Zur Einstellung des pH versetzt mit HCl und NaOH.

TRIS buffered saline (TBS) (10x)	10 % (v/v)
----------------------------------	------------

Tabelle 4.3 TRIS buffered saline + Tween (TBS-T)

TBS	99,9 %
Tween-20	0,1 %

Tabelle 4.4 Inhaltsstoffe für SDS-PAGE für 8% und 10% Trenngele

	8 % Gel	10 % Gel
Wasser	45,94 % (v/v)	39,96 % (v/v)
PAA (30 %)	27 % (v/v)	33 % (v/v)
1,5 M TRIS pH 8.8	25 % (v/v)	25 % (v/v)
10 % SDS	1 % (v/v)	1 % (v/v)
10 % APS	1 % (v/v)	1 % (v/v)
TEMED	0,06 % (v/v)	0,04 % (v/v)

Tabelle 4.5 Inhaltsstoffe für das Sammelgel für SDS-PAGE

	5 % Gel
Wasser	68,4 % (v/v)
PAA (30 %)	17 % (v/v)
1,0 M TRIS pH 6.8	12,5 % (v/v)
10 % SDS	1 % (v/v)
10 % APS	1 % (v/v)
TEMED	0,1% (w/v)

Tabelle 4.6 ECL-Lösung für Western Blot und Stock-Lösungen für die Inhaltsstoffe. Die ECL-Lösung wird vor der Benutzung zusammengemischt aus Lösung A and B 1:1

Stock Luminol

Luminol	0.44 g
DMSO	10 ml

Stock p-Cumarsäure

p-Cumarsäure	0.296 g
DMSO	20 ml

ECL Solution A

H ₂ O	84,6 % (v/v)
5 ml TRIS-Puffer	10 % (v/v)
Luminol stock	1 % (v/v)
220 µl p-Cumarsäure	4,4 % (v/v)

ECL Solution B

H ₂ O	89,36 % (v/v)
5 ml TRIS-Puffer	10 % (v/v)
30 % H ₂ O ₂	0,64 % (v/v)

Tabelle 4.7 Elektrophoresepuffer Stock (5x) für Western Blot.

TRIS-Base	125 mmol
Glycin	0,92 mol
SDS	0,5 % (w/v)

Tabelle 4.8 Transferpuffer.

Tris-HCl, pH 8,5	25 mmol
Glycin	192 mmol
Methanol	10 % (v/v)

Tabelle 4.9 Strippingpuffer, pH 2,0

Glycin	250 mmol
10 % SDS	10 % (w/v)

Tabelle 4.10 MACS-Puffer

DPBS	500 ml
EDTA (Versen)	100 ml
CS-FCS	2 ml

Tabelle 4.11 Laemmli-Puffer für die Proteinisolation.

Tris-HCl, pH 6,8	87,5 mmol
SDS	0,1 % (w/v)
Glycerol	5 % (w/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	0,1 % (w/v)

Tabelle 4.12 Zellkulturmedien

10x RBC-Lysis-Puffer

10x RBC-Lösung	1 ml
ddH ₂ O	9 ml

RPMI-Medium für PBMC-Kultivierung

RPMI-Medium (phenolrothaltig)	96,5 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
csFCS	2,5 %
hMCSF	4 ng/ml

RPMI (Hunger-) Medium für PBMC-Kultivierung

RPMI-Medium (phenolrotfrei)	96,5 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
csFCS	2,5 %
hMCSF	4 ng/ml

RPMI-Medium für THP1-Kultivierung

RPMI-Medium mit Phenolrot	87 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
L-Glutamin	1 %
Natriumpyruvat	1 %
FCS	10 %

RPMI-Hunger-Medium für THP1-Kultivierung

RPMI-Medium ohne Phenolrot	94,5 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
L-Glutamin	1 %
Natriumpyruvat	1 %
csFCS	2,5 %

Tabelle 4.13 Reagenzien zur Isolation reiner intakter Kerne

Zytoplasmatischer Extraktionspuffer

Reagenzien	Stock Menge	Finale Menge
TRIS (pH 7,6)	250 mmol	20 mmol
EDTA	25 mmol	0,1 mmol
MgCl ₂ ·6H ₂ O	50 mmol	2 mmol
NaF	100 mmol	0,5 mmol
Na ₃ VO ₄	100 mmol	0,5 mmol

Nukleärer Extraktionspuffer:

Reagenzien	Stock Menge	Finale Menge
HEPES (pH 7,9)	250 mmol	20 mmol
NaCl	1 mol	400 mmol
Glycerol	100x	25 % (v/v)
EDTA	25 mmol	1 mmol
NaF	100 mmol	0,5 mmol
Na ₃ VO ₄	100 mmol	0,5 mmol
DTT	100 mmol	0,5 mmol

Zu den hergestellten Pufferlösungen werden kurz vor der Verwendung 20 µl des 25x Protease-Inhibitor-Mixes und 10 µl des 100 mmol PMSF gegeben.

PMSF Stock Lösung (100×)

Es wird eine 100 mmolare Lösung von PMSF in Isopropanol vorbereitet. Die Lösung kann in Aliquots bei -20 °C für 6 Monate aufbewahrt werden. PMSF wird in einer finalen Konzentration von 1× genutzt.

Protease-Inhibitor (PI) Lösung (1×)

Es wurden 0,025% (w/v) PI, 0,005% (w/v) RNase, 0,1% (v/v) Triton X-100 and 0,1176% (w/v) Trisodium-Citrat-Dihydrat in H₂O gelöst. Die Lösung kann in Aliquots bei -20 °C für 6 Monate aufbewahrt werden.

IGEPAL CA-630 (10x): Eine 10 % (v/v) Lösung in Wasser wird vorbereitet.

Tabelle 5. FACS

Antikörper	gerichtet gegen Spezies	Hersteller	Verdünnung
CD45-VioBlue	Human	Miltenyi Biotec	1:50
CD14-APC-Vio 770	Human	Miltenyi Biotec	1:50

Tabelle 6. Antikörper

Erstantikörper	Lösungs- mittel	Verdünnung Erstantikörper	Zwei-Antikörper	Verdünnung Zweit- Antikörper	Hersteller
ER alpha (H-184)	1h 5% Milch	1:200 5 % Milch	Esel-anti-Hase	1:5000 5 % Milch	Santa Cruz
ER β (1531)	1h 5% Milch	1:500 5 % Milch	Esel-anti-Maus	1:5000 5 % Milch	Santa Cruz
GRP30 (N-15)	1h 5% Milch	1:1000 5 % Milch	Esel-anti-Hase	1:5000 5 % Milch	Santa Cruz
ERK (p44/42)	1h 5% BSA	1:1000 5 % BSA	Esel-anti-Hase	1:5000 5% BSA	Cell Signaling
pERK (pp44/42)	1h 5% BSA	1:2000 5 % BSA	Esel-anti-Hase	1:5000 5% BSA	Cell Signaling
Sirt1	1h 5% BSA	1:1000 5 % BSA	Esel-anti-Maus	1:5000 5 % BSA	Cell signaling
p53	1h 5% Milch	1:200 5 % Milch	Esel-anti-Hase	1:2000 5 % Milch	Santa Cruz
Acp53 (Lys379)	1h 5% Milch	1:500 5 % Milch	Esel-anti-Hase	1:2000 5 % Milch	ThermoFisher
Ku-70 (N3H10)	1 h 5% Milch	1:200 in 5 % Milch	Esel-anti-Maus	1:5000 5 % Milch	Santa Cruz
AcKu-70 (K331)	1 h 5% BSA	1:2000 5 % BSA	Esel-anti-Hase	1:5000 5 % BSA	Abcam
AcLysin	1h 5% BSA	1:2000 5 % BSA	Esel-anti-Hase	1:5000 5 % BSA	Cell signaling
NFκB p65	1h 5% BSA	1:200 5 % BSA	Esel-anti-Hase	1:5000 5% BSA	Santa Cruz
α-Tubulin	1 h 5% BSA	1:10000 5 % BSA	Esel-anti-Maus	1:10000 5 % BSA	Sigma
β-Actin	1h 5% Milch	1:2500 5 % Milch	Esel-anti-Maus	1:5000 5 % Milch	Santa Cruz
TIM-23	1h 5% Milch	1:3000 5 % BSA	Esel-anti-Maus	1:5000 5 % BSA	BD Biosciences
PDI	1h 5% Milch	1:1000 5 % BSA	Esel-anti-Hase	1:5000 5 % BSA	Cell signaling
GAPDH (MAB374)	1h 5% Milch	1:50000 5 % Milch	Esel-anti-Maus	1:5000 5 % Milch	EMD Millipore
Lamin B1	1h 5% Milch	1:1000 5 % Milch	Esel-anti-Hase	1:5000 5% Milch	Cell signaling

Tabelle 7. RNA-Primer

RNA-Primer	Amplicon Produktlänge	Primer Sequenz (5' → 3', fw = forward, rv = reverse)	Primerverhältnis fw-Primer: rv-Primer	Annealing- Temperatur
TNF-α	123 bp	fw-Primer: CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT rv-Primer: GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	1:1	15'' 95°C 1' 60°C
IL-1β	88 bp	fw-Primer: AGCTGATGGCCCTAAACAGA rv-Primer: GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	1:1	15'' 95°C 1' 60°C
CD80	110 bp	fw-Primer: CCAACCACAGCTTCATGTGTC rv-Primer: GGATGGGAGCAGGTTATCAGG	1:1	15'' 95°C 1' 60°C
HPRT	121 bp	fw-Primer: CTTTGCTGACCTGCTGGATT rv-Primer: TATGTCCCCTGTTGACTGGT	1:1	15'' 95°C 1' 60°C

Tabelle 8. Software

Endnote X9

Image Lab 5.2.1

Microsoft Office 2019

Prism 7

Alfasoft GmbH (Deutschland)

Bio-Rad (München)

Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)

GraphPad Software (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen in einer Sterilwerkbank der Sicherheitsklasse II durchgeführt. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert gelagert.

2.2.1.1 Beschreibung des Probandenkollektives für die PBMC-Isolation

An der Studie nahmen 26 Probanden teil. Die Probanden waren zwischen 19 und 58 Jahre alt mit einem Altersmedian von 24 Jahren. Es nahmen 13 weibliche und 13 männliche Probanden an der Studie teil.

Die Inklusionskriterien für die Gruppen waren ein Alter zwischen 18 and 75 Jahren und das Fehlen von vordefinierten Exklusionskriterien. Zu den Exklusionskriterien zählten Vorerkrankungen wie: Koronare Herzerkrankung und andere kardiale Erkrankungen, Hyperlipidämie, Dyslipidämie, renale Funktionsstörungen, Lebererkrankungen, Krebserkrankungen, Diabetes, akute und chronische inflammatorische Erkrankungen, rheumatische Erkrankungen, hämatopoetische Funktionsstörungen, Schwangerschaft, kognitive Beeinträchtigungen und die Unfähigkeit, den Studienbedingungen zuzustimmen.

Die Probanden wurden über den Inhalt und die Ziele der Studie informiert und es erfolgte eine körperliche Untersuchung auf Studientauglichkeit. Alle Versuchsteilnehmer erhielten eine schriftliche Probandeninformation und eine Einverständniserklärung zur Unterschrift. Die Zustimmung der Ethikkommission des Instituts für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM) liegt vor (Nr. EA1/070/16, Datum 10.03.2016).

2.2.1.2 PBMC-Isolation aus Primärblut

Den Probanden wurden 80 ml venöses Blut steril abgenommen. Das in EDTA-Vacutainern befindliche Probandenblut wurde in Zellkulturgefäßen 1:2 mit DPBS verdünnt. Anschließend wurde das Blut auf Ficoll geschichtet, sodass zwei klar getrennte Schichten entstehen. Im Anschluss erfolgte das Zentrifugieren für 20 min mit 1700 rpm bei 20 °C.

Nach der Zentrifugation befand sich zwischen der oberen Plasmaschicht und dem Ficoll die PBMC-Schicht (Buffy coat). Die PBMC-Schicht wurde in ein separates Zellkulturgefäß überführt und anschließend 20 min mit 1100 rpm bei 20 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1x Red Blood Cell (RBC) Lysis-Puffer resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 5min

bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml MACS-Puffer (*magnetic activated cell sorting*) resuspendiert.

2.2.1.3 Isolation der Monozyten mit magnetic beads

Eine zuverlässige Methode, mit der man CD14-positive Zellen aus der PBMC-Schicht isolieren kann, ist die magnetische Zelltrennung (MACS). Hierzu wurden die Monozyten mit CD14-Mikrobeads markiert.

Pro 10 Millionen ausgezählte Zellen wurden 80 µl MACS-Puffer und 10 µl Microbeads zugesetzt. Anschließend wurde für 25 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden 5 min bei 1300 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Wird die Zellsuspension anschließend auf eine MACS-Separations-Säule gegeben, bleiben die magnetisch markierten Zellen (CD14⁺-Fraktion) haften, während die nichtmarkierten Zellen (CD14⁻-Fraktion) die Säule ungebunden durchlaufen.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau und Neubauer Zählkammer

Zur Zellzählung wurden Zellsuspension und Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau färbt ausschließlich tote Zellen blau an, da es beschädigte Plasmamembranen durchdringt. Es wurden die lebenden Zellen in vier Großquadraten (16 Kleinquadrate) ausgezählt.

Die Zellzahl pro ml Suspension errechnet sich aus der Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{mittlere Zahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.1.5 Kultivierung der Monozyten

Die CD14⁺-Zellsuspension wurde bei 1300 rpm und 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in phenolrotfreiem RPMI-Medium resuspendiert und mit der Neubauer Zählkammer gezählt. 1,5x10⁶ Zellen pro Well wurden in 6-Well Zellkultur-Platten ausgesät und bei 37 °C mit 5 % CO₂ für 72 Stunden kultiviert.

2.2.1.6 Stimulation der Monozyten

Nach der Kultivierung über 72 Stunden erfolgte eine Stimulation mit LPS (10 ng/ml) und IFN-γ (10 ng/ml) für die M1-Polarisation. Ein unstimulierter Ansatz von M0-Monozyten diente als Kontrolle. Die anschließende Stimulation erfolgte mit 10 nmol/L (10⁻⁸ mol/L) Östradiol (E2). Die LPS- und IFN_γ-Zugabe erfolgte genau eine Stunde vor der Zugabe des Östradiols.

Es erfolgte die Verwendung von mit Cyclodextrin enkapsuliertem 17β -Östradiol. Diese wasserlösliche Form des Östradiols enthält 4,69 Gew.-% reines Östradiol pro Gramm, der Rest besteht aus dem Lösungsvermittler 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. Das verwendete mit Cyclodextrin enkapsulierte 17β -Östradiol (c-E2) hat eine molare Masse von 272,38 g/mol. Demnach braucht man 272 g c-E2, um eine Lösung von 1 mol/L herzustellen. Somit müssen 5,81 mg des c-E2 in 1 ml Wasser gelöst werden, um eine Lösung mit 1 mmol/L reinem E2 zu erhalten. Das reine Östradiol wurde vor den jeweiligen Versuchen mit sterilem Zellkulturwasser auf 10 nmol/L (10^{-8} mol/L) verdünnt. Die genutzte Endkonzentration an reinem Östradiol betrug somit 10^{-8} mol/L im entsprechenden Well. Um einen Einfluss von Dextrin auf die Zellen auszuschließen, wurde in entsprechende Kontroll-Wellen Cyclodextrin in äquivalenter Konzentration dem Zellkulturmedium hinzugegeben. Diese Dextrin-Kontrollen werden in den nachfolgenden Versuchen als „Vehikel“-Kontrollen bezeichnet.

Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Eine Kontrolle der erfolgreichen Polarisation wurde mit dem Lichtmikroskop durchgeführt.

2.2.1.7 Auftauen und Passagieren der THP1-Zelllinie

Für einige Versuche wurde die humane Makrophagen-Zelllinie THP1 verwendet. Zum Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein Falcon-Röhrchen mit RPMI-Medium überführt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in RPMI-Medium resuspendiert und die Suspension wurde in Zellkulturgefäße überführt. Die Kulturen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Passagieren der Suspensionszellen THP1 erfolgte durch Zentrifugation mit 1000 rpm für 5 min und anschließende Resuspension in Kulturmedium und Überführung in ein neues Zellkulturgefäß.

2.2.1.8 Stimulation der humanen Makrophagen-Zelllinie THP1

Nach einer 24-stündigen Kultivierung in phenolrothaltigem Kultivierungsmedium erfolgte eine Umstellung auf phenolrotfreies RPMI-Medium für die anschließende Stimulation. Die Polarisation erfolgte mit LPS (10 ng/ml) und IFN- γ (10 ng/ml) für die M1-Polarisation. Ein unstimulierter Ansatz von M0-Monozyten diente als Kontrolle. Die anschließende Stimulation erfolgte mit 10 nmol/L (10^{-8} mol/L) Östradiol (E2). Die LPS- und IFN γ -Zugabe erfolgte genau eine Stunde vor der Zugabe des Östradiols.

Es erfolgte die Verwendung von mit Cyclodextrin enkapsuliertem 17 β -Östradiol (wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben). Um einen Einfluss von Dextrin auf die Zellen auszuschließen, wurde auch hier in entsprechende Kontroll-Wellen Cyclodextrin in äquivalenter Konzentration (10 nmol/L) dem Zellkulturmedium hinzugegeben. Diese Dextrin-Kontrollen werden in den nachfolgenden Versuchen als „Vehikel“-Kontrollen bezeichnet.

Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Eine Kontrolle der erfolgreichen Polarisation wurde mit dem Lichtmikroskop durchgeführt.

2.2.2 FACS

2.2.2.1 Reinheitsanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Reinheit der durch magnetische Zelltrennung (MACS) separierten CD14-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) überprüft. Bei der Durchflusszytometrie werden die Größe der Zellen im Vorwärtsstreulicht (FSC: forward scatter; Lichtbeugung) und die Granularität der Zellen im Seitwärtsstreulicht (SSC: siteward scatter; Lichtbrechung) gegenübergestellt.

Durch das „Anfärben“ bestimmter Zellpopulationen mit Antikörpern gegen die jeweiligen Oberflächenantigene können die Zellen sortiert werden. Hierzu wurden folgende monoklonale mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper verwendet: Fluoreszein Isothiozyanat (FITC), Phytoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP).

Farbstoff	Anregungswellenlänge	Emissionsmaximum
FITC (Fluoreszein Isothiozyanat)	488nm	530nm
PE (Phytoerythrin)	488nm	580nm
APC (Allophycocyanin)	633nm	660nm
PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	488nm	670nm

Die Mischung wurde kurz gevortext und dann für 10 min auf Eis gestellt, damit die Antikörper spezifisch an CD14 binden können. Die anschließende Zentrifugation erfolgt bei 290 g für 10 min bei 4 °C. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 100 μ l MACS-Puffer resuspendiert und dann auf eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Analyse erfolgte mit dem FACS-Gerät MACS-Quant.

2.2.3 Proteine

2.2.3.1 Proteinextraktion mittels Laemmli-Puffer

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen mit 50 µl Laemmli-Puffer versetzt und mit einem Zellkulturschaber gekratzt. Das Zellysate wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, anschließend bei 96 °C für 5 min auf dem Heizblock gekocht und bis zur weiteren Analyse bei - 80 °C eingefroren.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Pierce 660 nm Protein Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Pierce 660 nm Protein Assay nach Herstellerprotokoll. Als Referenz zu den Proben wurde eine Standard-Reihe angelegt mit Pre-diluted Protein Assay Standards (Bovine Serum Albumin (BSA) Set). Die Proteinmessung wurde bei 660 nm mit einem ELISA-Reader durchgeführt.

2.2.3.3 SDS-PAGE und Western Blot

Für die Western Blot-Analyse wurden das Sammelgel und das Trenngel in der Reihenfolge, die in der Materialliste vorgegeben ist, zusammen pipettiert und in die Gelkammern gegeben. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die gleiche Menge an Protein pro Geltasche aufgetragen. Die Gele liefen zunächst 20 Minuten bei 80 V und 400 mA, bis das Sammelgel erreicht ist. Danach wurden große Gele auf 110 V, 400 mA hochgestellt für ca. 3 ½ Stunden, kleine Gele wurden auf 120 V, 400 mA für ca. 2 ½ Stunden gestellt.

Anschließend erfolgte der Aufbau des Sandwiches im Nassblotverfahren. Die Blotkassette wurde in die Kammer gesetzt und mit eiskaltem Transferpuffer (1x) gefüllt. Die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V und 400 mA für ca. 2 ½ Stunden. Das Färben der Proteinbanden erfolgte mit Ponceau S (Sigma, H₂O-löslich).

Das Blocken erfolgte mit 5 % Bovinem Serum Albumin (BSA) bzw. 5 % Magermilch-Pulver. Das Blocken diente dazu, unspezifische Proteinbindungsstellen für nachfolgende Antikörper abzudecken. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen folgende Proteine gerichtet sind: Sirt1, Sirt3, p53, Acp53, Ku70, AcKu70 und AcLysin (siehe 4.1. Material, Tabelle 6 Antikörper). Nach einstündiger Inkubation mit einem Zweitantikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war, erfolgte die Sichtbarmachung der Proteinbanden durch eine Chemolumineszenz-Reaktion. Nach der Detektion wurde die Membran in Stripping-Puffer gelegt, um die Antikörper zu entfernen.

2.2.3.4 Normalisierung der Western Blot-Daten

Die Analyse der Proteinmenge des Zielproteins erfolgte durch Normalisierung gegen ein Haushaltsprotein. Hierfür wurde Tubulin im Vollzelllysat primärer humaner Makrophagen genutzt. In THP1-Zellen erfolgte die Normalisierung im Vollzelllysat sowie in der zytosolischen Komponente auf das Haushaltsprotein GAPDH, da Tubulin bei den THP1-Zellen eine Regulierung zeigte. In der nukleären Komponente wurde Lamin B1 verwendet.

Studien zeigen jedoch, dass auch Haushaltsproteine in Zellen nicht immer gleichmäßig vorhanden sind und je nach Zelltyp und Stimulus variieren können.^{102,103} Deshalb erfolgte bei der Quantifizierung der Proteinmengen ein zusätzlicher Bezug auf das Gesamtprotein mittels Normalisierung auf Ponceau S. Um den Hintergrund zu berücksichtigen, wurde die *rolling disc background* Substraktion in Image Lab genutzt. Ponceau S ist ein Farbstoff, dessen negativ geladene Gruppen an positiv geladene Aminosäure-Reste von Membran-gebundenen Proteine binden. Studien zeigen, dass der Bezug auf das Gesamtprotein (*Total Protein Staining*) als reliable Kontrolle für die Normalisierung des Proteingehaltes genutzt werden kann.¹⁰⁴ Insbesondere Ponceau S wird als optimale Normalisierungsalternative genannt, teilweise sogar als präferierte Ladungskontrolle hervorgehoben.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Bei acetylierten Proteinen wie Acp53 und AcKu70 wurde auf die Gesamtmenge des jeweiligen Proteins normalisiert. Bei Messung von acetyliertem Lysin erfolgte die Normalisierung auf das Haushaltsprotein Tubulin¹⁰⁸⁻¹¹⁰ und zusätzlich wurde eine Normalisierung auf Ponceau vorgenommen. Der genutzte Antikörper gegen acetyliertes Lysin detektiert Proteine, die posttranslational modifiziert wurden durch eine Acetylierung an den Epsilon-Amino-Gruppen von Lysin-Abkömmlingen. Der Antikörper erkennt nach Herstellerinformation acetylierte Histone, p53, CREB binding protein, den P300/CBP-assoziierten Faktor (PCAF) und chemisch acetyliertes BSA.

Bei der Normalisierung auf Ponceau zeigten sich keine relevanten Unterschiede zur Normalisierung auf die übrigen Referenzproteine, deshalb werden im Ergebnisteil der Dissertation nur die Daten zur Normalisierung auf Haushaltsproteine aufgeführt. Die Ponceau-Daten werden aus Übersichtlichkeitsgründen im Anhang gezeigt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Image Lab, Version 5.2.1.

2.2.4 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit RNA-Bee-Reagenz. Es wurden 1 ml RNA-Bee pro 10 cm² Oberfläche des Wells hinzugegeben. Die Wells wurden mit einem Zellkulturschaber gekratzt.

Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform pro 1 ml verwendetes Reagenz hinzugegeben. Die homogenisierte Probe wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert, damit der Nukleoprotein-Komplex dissoziiert, anschließend für 10 min bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert und gevortext. Anschließend wurde die RNA über Nacht bei - 20 °C gefällt. Nach der Präzipitation wurde die Probe für 30 min bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert. Die Mischung teilte sich in eine untere blaue Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase. Die RNA befand sich ausschließlich in der wässrigen oberen Phase.

Die wässrige obere Phase der Probe wurde abpipettiert. Die abpipettierte Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden 0,5 ml 100%iges Isopropanol pro 1ml verwendetes RNA-Bee hinzugefügt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 14000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, nur das RNA-Pellet bleibt zurück.

Das Pellet wurde mit 1 ml 75%-igem Ethanol pro 1 ml verwendetem RNA-Bee gewaschen. Die Probe wurde gevortext und anschließend bei 8000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8000 g für 5 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde der Waschschrift wiederholt, indem erneut Ethanol hinzugegeben und die Probe zentrifugiert wurde. Das Ethanol wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Das Pellet wurde in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser gelöst und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Die RNA-Konzentration wurde unter Verwendung des NanoDrop ND-100 Spektrophotometers gemessen. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die Reinheit der RNA wurde durch das Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ gemessen.

2.2.5 Reverse Transkription

Die Pipettierschritte der reversen Transkription erfolgten alle auf Eis. Die Probe wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10 μ l verdünnt. Es wurden 2 μ l Random-Primer hinzugegeben. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 70 °C auf dem Heizblock inkubiert.

Während der Inkubation wurde folgender Mastermix zusammengestellt:

	Endkonzentration:
Pro Probe: 4 µl 5x Puffer	[1x]
2 µl DTT	[10 mmol]
1 µl RNasin	[2 U/µl]
1 µl dNTP	[0.5 mmol]

Wenn die Proben auf Eis stehen, wurden folgende Reagenz hinzugegeben:

1 µl Superscript	[10 U/µl]
------------------	-----------

Die Proben wurden für 3 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend je 9 µl Mastermix zugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und erst 10 Minuten bei Raumtemperatur, dann 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Zur Denaturierung des Enzyms wurde die Probe 5 Minuten bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert und danach auf Eis gestellt. Nach einer erneuten Zentrifugation erfolgte die PCR-Verdünnung auf 5 ng/µl.

2.2.6 Isolation reiner intakter Kerne

Die Isolation reiner intakter Kerne erfolgte in Anlehnung an das Nature-Protokoll zur Isolation reiner intakter Kerne von Rosner et al.¹¹¹

Zu den hergestellten Pufferlösungen wurden kurz vor der Verwendung 20 µl des 25x Protease-Inhibitor-Cocktail und 10 µl des 100 mmol Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gegeben. Die endgültige Konzentration des Protease-Inhibitor (PI) ist somit 1x und von PMSF 1 mmol.

Es wurden 5×10^6 THP1-Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden mit eisgekühltem PBS gewaschen und in zytoplasmatischem Extraktionspuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation über 2 min erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Es wurden 35 µl des Puffers 10x IGEPAL CA-630 hinzugegeben, um eine finale Konzentration von 1x zu erreichen. Nach vorsichtiger Homogenisation erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 500 g für 3 min. Der pure intakte Nukleus setzte sich als Pellet ab, während der Überstand das zytoplasmatische Extrakt ist. Der Überstand wurde in ein separates Eppendorf-Gefäß überführt.

Das Pellet wurde mit 1x IGEPAL CA-630 in zytoplasmatischem Extraktionspuffer versetzt und bei 4 °C und 500 g für 3 min zentrifugiert. Die Zellen wurden erneut mit 1x IGEPAL CA-630 in

zytoplasmatischem Extraktionspuffer gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in nukleärem Extraktionspuffer gelöst und anschließend gevortext. Das nukleäre Extrakt wurde zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Durch Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation bei 4 °C und 20000 g für 20 min wurden die löslichen nukleären Proteine (Überstand) von der nicht-löslichen Fraktion (Pellet) getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung bei - 80 °C eingefroren.

2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte anhand von Mittelwerten und deren Standardabweichung, wobei der Mittelwert sich aus den biologischen Replikaten ergibt. Alle Rohdaten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL® aufgelistet und mit Prism 5 inferenzstatistisch ausgewertet.

Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen zu realisieren, wurden alle Werte auf den Basalwert normalisiert. Für paarweise Mittelwertsvergleiche wurden der Mann-Whitney U-Test genutzt.

Bei den jeweiligen Testverfahren wurden Unterschiede als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $*p \leq 0,05$ betrug. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $**p \leq 0,01$ wurden die Unterschiede als sehr signifikant und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $***p \leq 0,001$ sowie $****p < 0,0001$ als höchst signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der Aktivierung der Östrogen-Rezeptoren in humanen Makrophagen

3.1.1 Nachweis der Reinheit der Monozyten-Population bei der Isolation von primären humanen Monozyten

Um die Reinheit der isolierten Population der primären humanen Monozyten nachzuweisen, wurde eine FACS-Analyse der isolierten PBMC-Zellen durchgeführt. CD14 ist ein Oberflächen-Protein, das vor allem von Monozyten von Säugetieren gebildet wird, nicht jedoch von den anderen peripheren Blutzellen. Mit der Ficoll-Paque® Methode und magnetischer Zellseparation konnte eine Reinheit der CD14⁺-Zellen zwischen 85 % und 99 % erreicht werden, während CD14-negative Lymphozyten mit unter 5 % nachweisbar war (Abb. 2 A). In der CD14⁻-Population hingegen waren kaum CD14⁺-Zellen nachweisbar (Abb. 2 B).

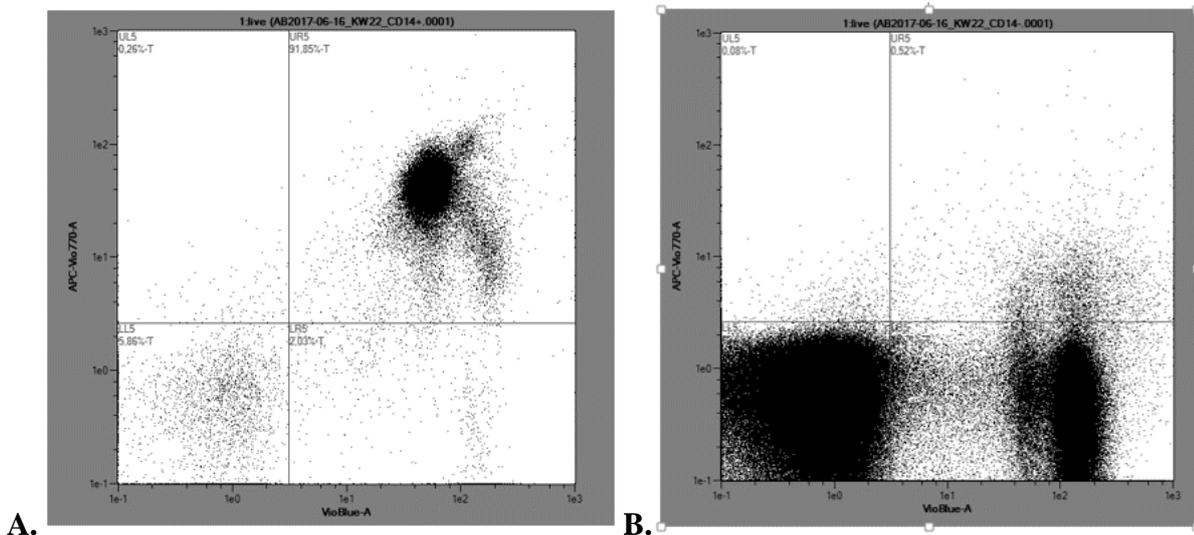


Abbildung 2. FACS-Analyse von primären humanen Monozyten mit CD45-VioBlue und CD14-APC-Vio 770 Antikörper.

CD14 ist in humanen Monozyten exprimiert, CD45 ist ein allgemeines Leukozyten-Oberflächenprotein.

A. FACS-Analyse der CD14⁺-Population unmittelbar nach der Isolation von primären humanen Monozyten.

B. FACS-Analyse der CD14⁻-Population unmittelbar nach der Isolation.

3.1.2 Nachweis der Polarisation von primären humanen Monozyten (M0) zu M1-Makrophagen mittels PCR

Um die Effekte von Östrogen auf die Proteinmenge von Sirt1 und dessen Zielproteine im Entzündungsvorgang zu untersuchen, wurden zunächst die kultivierten primären humanen M0-Monozyten mit LPS und IFN- γ zu M1-Makrophagen polarisiert. Der Nachweis der erfolgreichen Polarisation der primären humanen Monozyten zu M1-Makrophagen erfolgte mittels qPCR. Als

klassische M1-Marker, die in unpolarierten M0-Monozyten kaum vorhanden sind, wurden TNF- α , IL-1 β und CD80 analysiert. In mit LPS und IFN- γ polarisierten weiblichen Makrophagen zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expression der M1-spezifischen Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β und CD80 (Abb. 3). In männlichen Makrophagen war ein deutlicher Anstieg von TNF- α und IL-1 β (Abb. 4), während sich die CD80-Expression nicht signifikant veränderte.

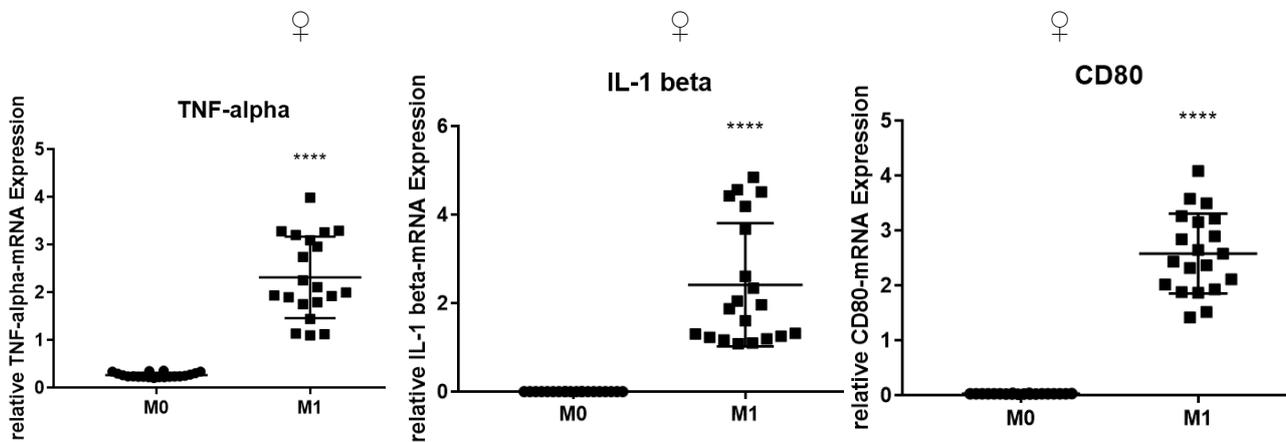


Abbildung 3. Nachweis der M1-Polarisation in **weiblichen** primären humanen M1-Makrophagen.

Statistische Analyse der relativen Expression der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β und CD80 ($n=3$, **** $p < 0,0001$) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen. Als Kontrolle diente ein unstimulierter M0-Ansatz.

Die Proben wurden als biologische Triplikate aufgetragen. Zusätzlich wurden technische Duplikate jeder Probe erstellt. HPRT wurde als Ladungskontrolle genutzt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

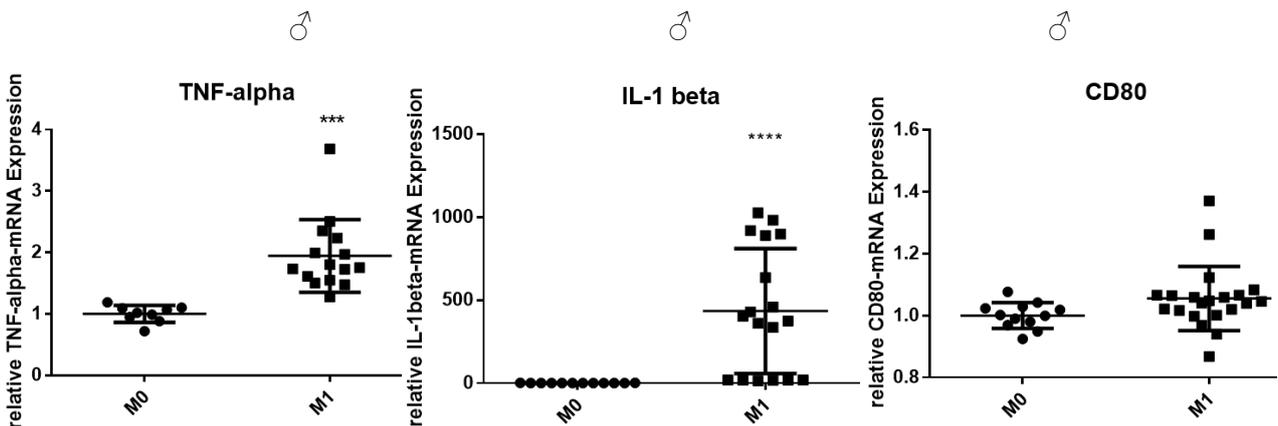


Abbildung 4. Nachweis der M1-Polarisation in **männlichen** primären humanen M1-Makrophagen.

Statistische Analyse der relativen Expression der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β und CD80 ($n=3$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen. Als Kontrolle diente ein unstimulierter M0-Ansatz.

Die Proben wurden als biologische Triplikate aufgetragen. Zusätzlich wurden technische Duplikate jeder Probe erstellt. HPRT wurde als Ladungskontrolle genutzt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.1.3 Morphologie von M1-Makrophagen

Um die Morphologie der primären humanen Makrophagen zu beurteilen, wurden primäre humane Monozyten zu Makrophagen differenziert (Abb. 5). Bereits 4 Stunden nach der Zugabe der Differenzierungszytokine konnte ein Unterschied in der Zellform zwischen undifferenzierten M0-Monozyten und differenzierten M1-Makrophagen festgestellt werden. M0-Monozyten hatten ein spindelförmiges Erscheinungsbild, während die M1-Polarisation zu einer Abflachung in eine eher runde Form führte (Abb. 5 B). Zwischen weiblichen und männlichen Makrophagen zeigte sich kein morphologischer Unterschied.

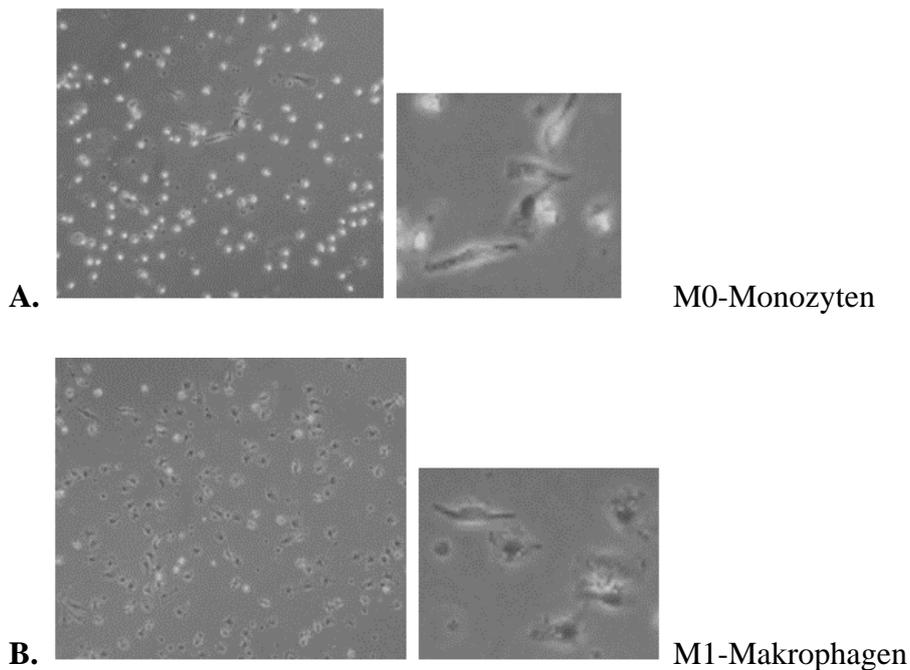


Abbildung 5. Morphologie von männlichen M1-Makrophagen nach 4 h Behandlung mit LPS und IFN- γ für die M1-Polarisation

Die M0-Monozyten blieben ohne Behandlung.

A. M0-Monozyten nach 4 h, ohne Behandlung. Vergrößerung 10x und 40x.

B. M1-Makrophagen 4 h nach Behandlung mit LPS (10 ng/ml) und IFN- γ (10 ng/ml). Vergrößerung 10x und 40x.

3.1.4 Nachweis der Östrogen-Rezeptoren ER α , ER β und GPR30 in primären humanen Makrophagen

Das Vorhandensein der Östrogen-Rezeptoren ER α , ER β und GPR30 in primären humanen M1-Makrophagen wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb. 6). Die Rezeptoren waren sowohl in weiblichen als auch in männlichen Makrophagen vorhanden. In männlichen Makrophagen war der Gehalt an Östrogenrezeptoren geringer als in weiblichen Makrophagen.

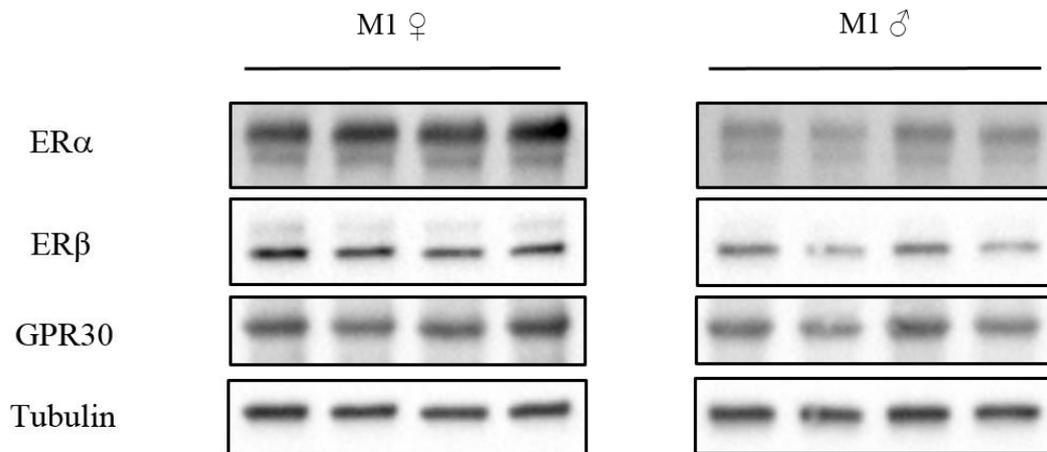
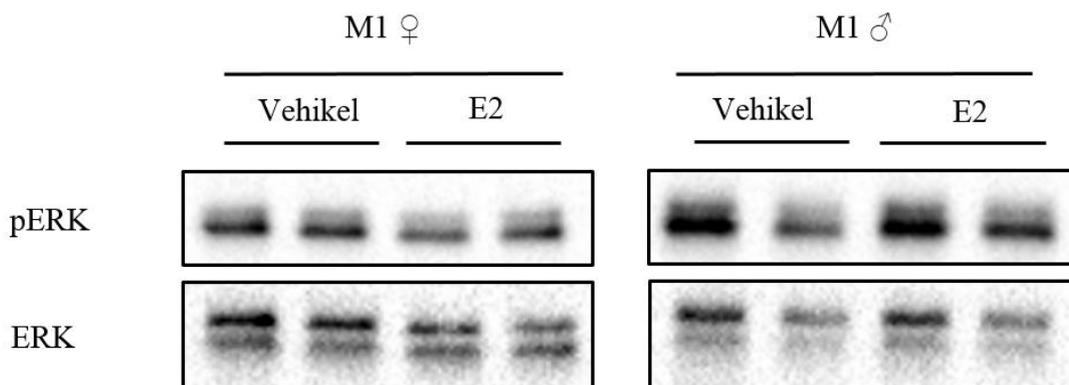


Abbildung 6. Nachweis der Östrogenrezeptoren ER α , ER β und GPR30 in weiblichen und männlichen primären humanen M1-Makrophagen. n=2. Die Blots stammen von derselben Membran.

3.1.5 Nachweis der erhöhten Phosphorylierung von ERK nach Behandlung mit E2

Es ist bekannt, dass Östrogen durch Phosphorylierung die Kinase ERK aktiviert. Um den Effekt der Behandlung mit E2 nachzuweisen, wurde das Verhältnis pERK / ERK mittels Western Blot analysiert. Eine Kurzzeitbehandlung von 20 min zeigte keinen Effekt auf das Verhältnis pERK / ERK ($p > 0,05$). Bei einer Langzeit-Behandlung der primären humanen Makrophagen zeigte sich sowohl in männlichen als auch in weiblichen Zellen nach 24 h eine deutliche Zunahme der ERK-Phosphorylierung und damit Aktivität (** $p < 0,01$) (Abb. 7).



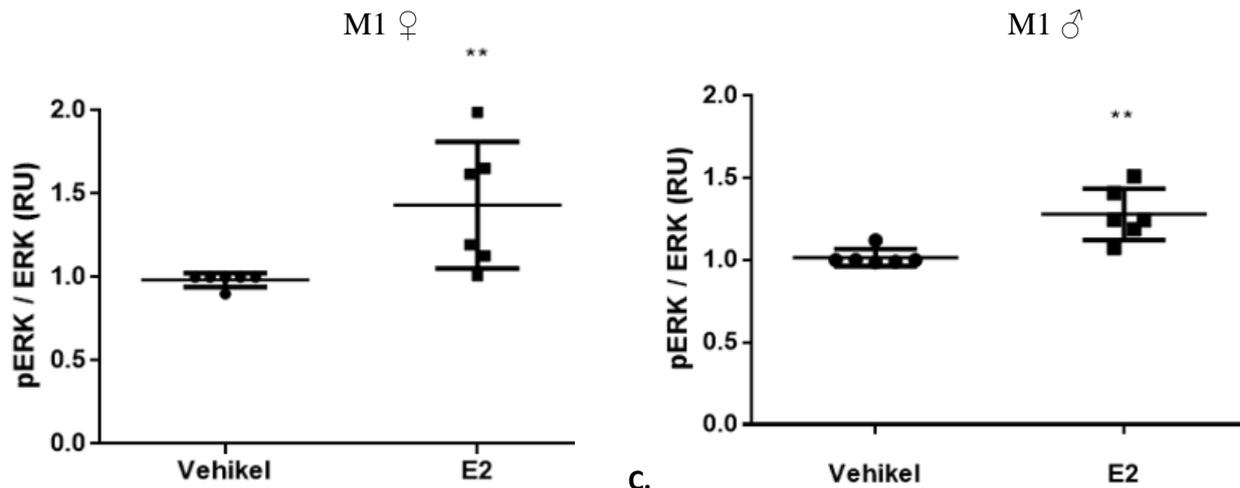


Abbildung 7. ERK-Phosphorylierung in humanen primären männlichen und weiblichen M1-Makrophagen nach 24-stündiger Stimulation mit E2
 E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

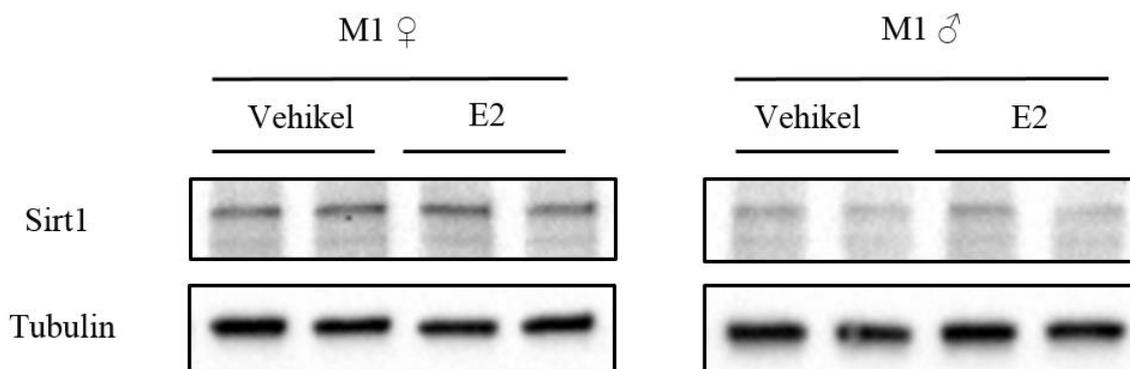
A. Western Blot-Analyse von pERK und ERK in M1-stimulierten primären humanen Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. Tubulin wurde als Ladungskontrolle genutzt. Die Blots stammen von derselben Membran.

B. Statistische Analyse der ERK-Aktivität (pERK zu ERK, n=6, **p < 0,01) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, behandelt mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

C. Statistische Analyse der ERK-Aktivität (pERK zu ERK, n=6, **p < 0,01) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.1.6 Effekte der ER-Aktivierung auf die Sirt1-Proteinmenge in M1-differenzierten primären humanen Makrophagen

Um die Effekte von E2 auf den Sirt1-Proteingehalt zu untersuchen, wurden primäre humane Monozyten aus gesunden männlichen und weiblichen Individuen für 24 h mit LPS und IFN- γ zu M1-Makrophagen polarisiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit E2 für 24 h, als Vehikel-Kontrolle diente Dextrin. Die Sirt1-Menge wurde mittels Western Blot analysiert. Es konnten keine Auswirkungen von E2 auf die Sirt1-Menge in weiblichen und männlichen primären M1-Makrophagen beobachtet werden (p > 0,05) (Abb. 8).



A.

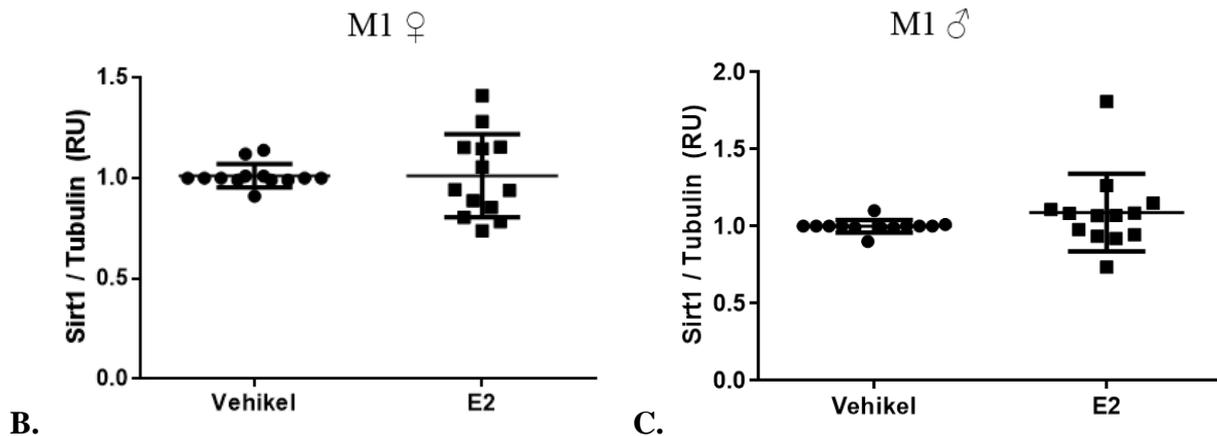


Abbildung 8. Sirt1-Proteinmenge in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen
E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse von Sirt1 in M1-stimulierten primären humanen Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. Tubulin wurde als Ladungskontrolle genutzt. Die Blots stammen von derselben Membran.

B. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Menge in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. (n=13, $p > 0,05$)

C. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Menge in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. (n=13, $p > 0,05$)

3.1.7 Auswirkung der Aktivität von Sirt1 auf die Acetylierung von Lysinresten sowie die Protein-Deacetylierung der Sirt1-Zielproteine (Acp53, AcKu70)

a) Acetylierung von Lysinresten

Um die Effekte von E2 auf die Sirt1-Aktivität zu messen, wurde zunächst die Acetylierung von Lysinresten mittels Western Blot analysiert.

Die Acetylierung von Lysin blieb unbeeinflusst von der Stimulation mit E2 ($p > 0,05$, Abbildung 9).

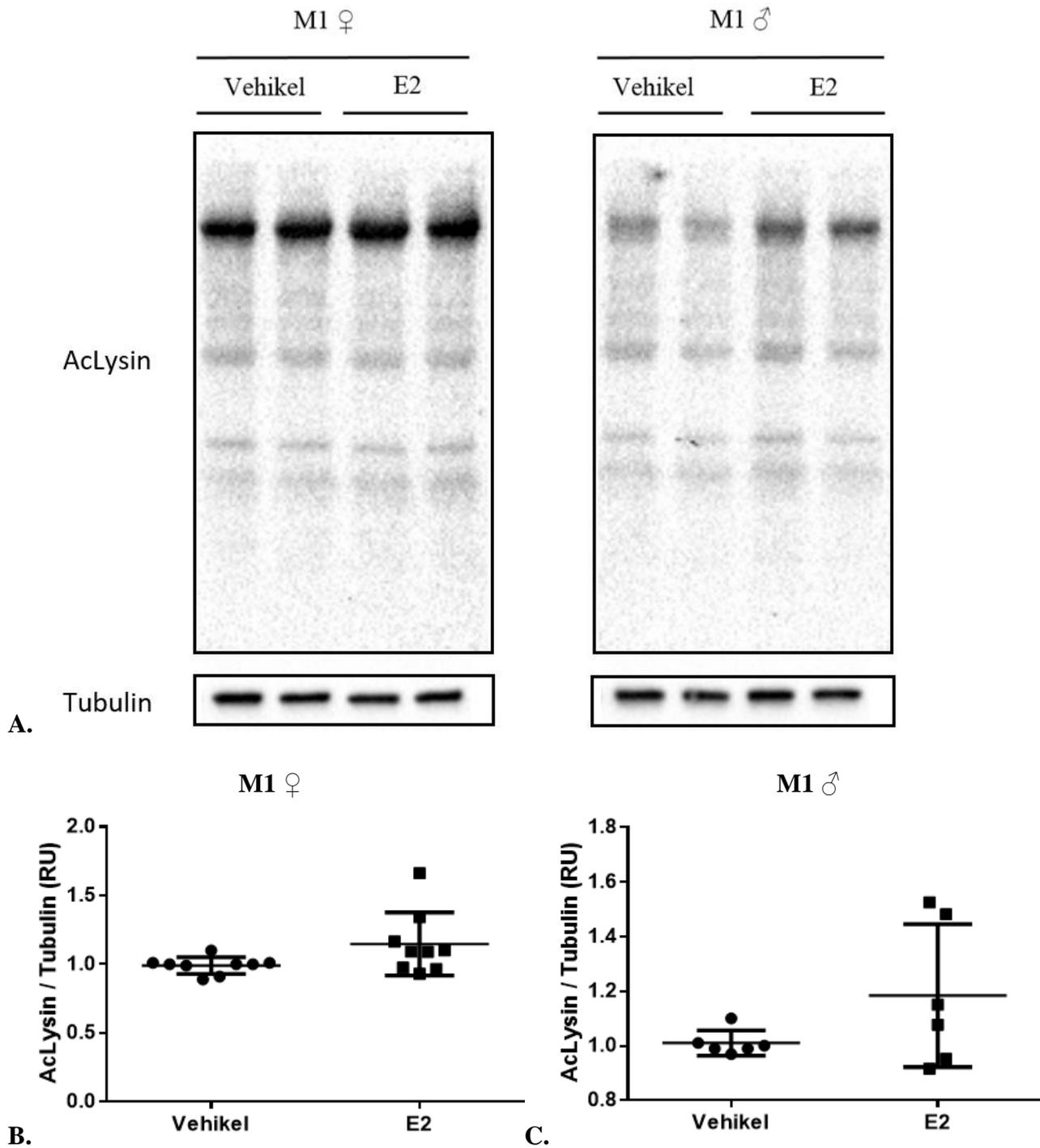


Abbildung 9. Proteinmenge von AcLysin in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse von AcLysin in M1-stimulierten primären humanen Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. Tubulin wurde als Ladungskontrolle genutzt. Die Blots stammen von derselben Membran.

B. Statistische Analyse der Menge von AcLysin in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. (n=9, p > 0,05)

C. Statistische Analyse der Menge von AcLysin in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. (n=6, p > 0,05)

b) Acetylierung von p53 und Ku70

Weiterhin wurden die Effekte von E2 auf die Sirt1-Aktivität spezifischer über die Acetylierung von Lysin und den nukleären Sirt1-Zielproteine p53 und Ku70 gemessen. Dabei wurde die Acetylierung der Proteine p53 und Ku70 auf die Gesamtmengen von p53 und Ku70 bezogen. Bei Stimulation mit E2 konnte in weiblichen Makrophagen eine erhöhte Acetylierung von p53 um 40 % beobachtet werden (Verhältnis Acp53 zu p53, * $p < 0,05$) (Abbildung 10), während sich in männlichen Makrophagen keine signifikante Veränderung der Acetylierung zeigte.

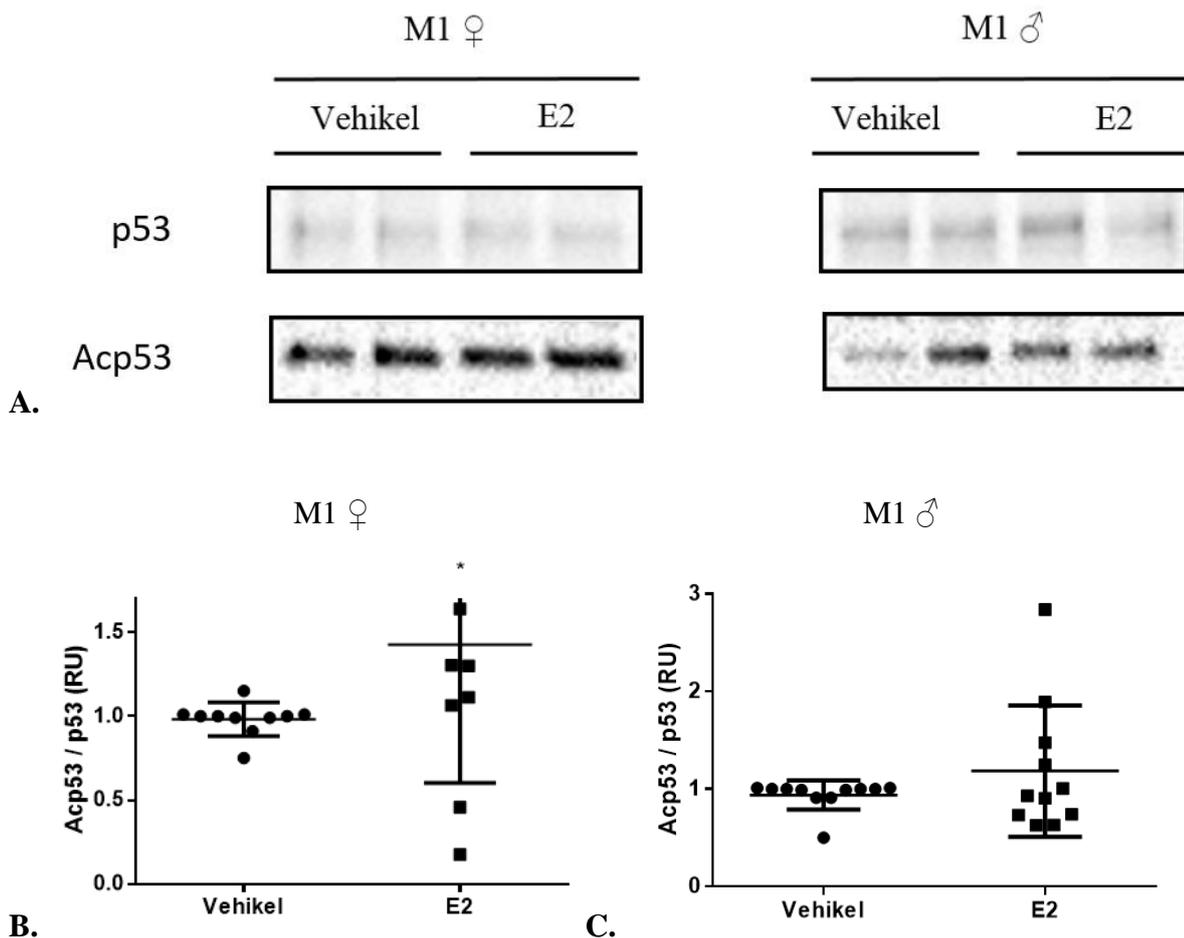


Abbildung 10. Einfluss einer Behandlung mit E2 auf die Acetylierung von p53 in primären humanen weiblichen und männlichen M1-Makrophagen
E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse der Acetylierung von p53 in M1-stimulierten primären humanen Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. Die gezeigten Western Blots von männlichen und weiblichen Individuen stammen von unterschiedlichen Membranen.

B. Statistische Analyse der Acetylierung von p53 (n=10, * $p = 0,034$) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

C. Statistische Analyse der Acetylierung von p53 (n=11, $p = 0,99$) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

c) Acetylierung von Ku70

Die Acetylierung des nukleären Proteins Ku70 nahm sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Makrophagen um 40 % zu (Verhältnis AcKu70 zu Ku70, M1 ♀ ***p < 0,001, M1 ♂ **p < 0,01) (Abbildung 11).

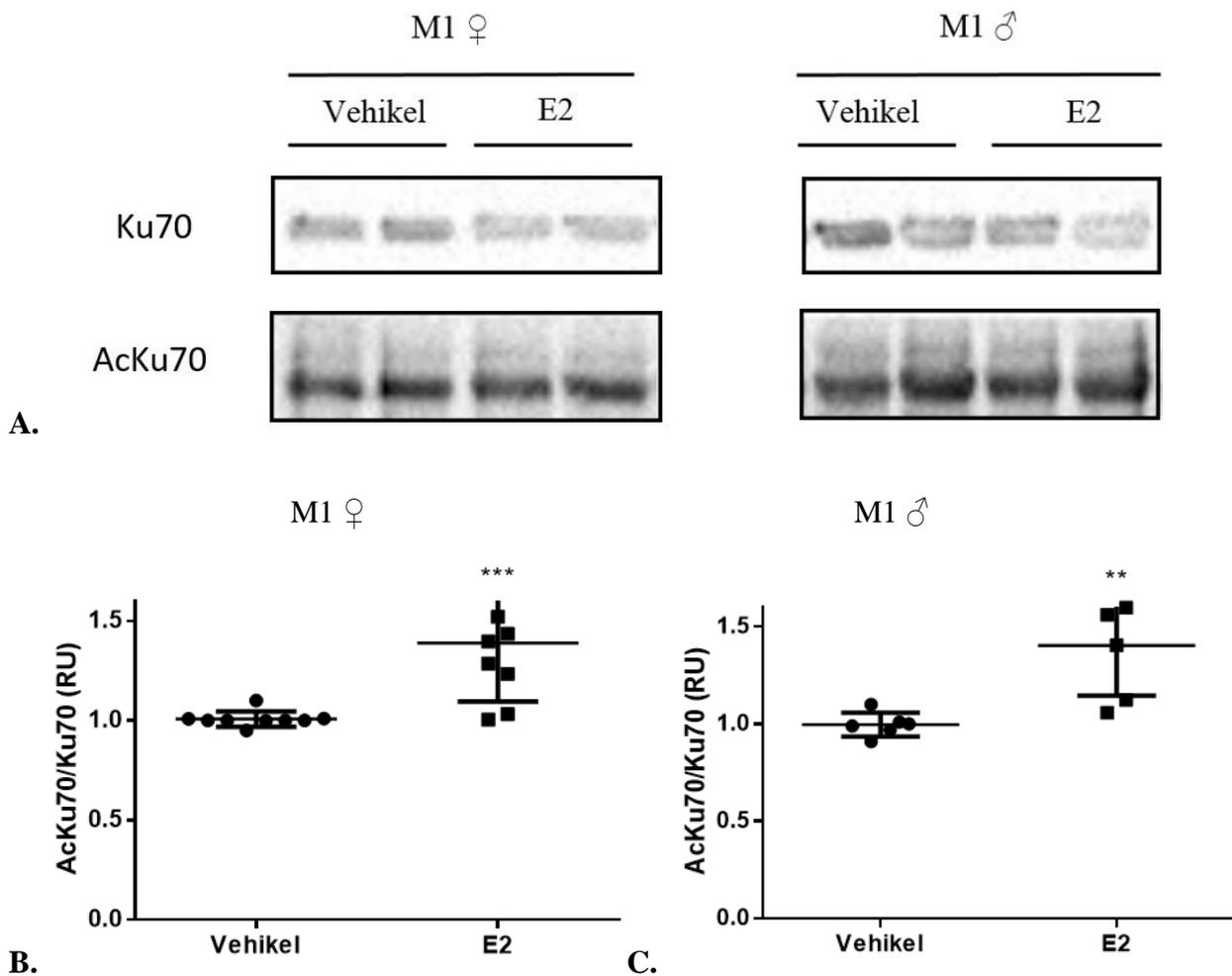


Abbildung 11. Einfluss einer Behandlung mit E2 auf die Acetylierung von Ku70 in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen
E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse der Acetylierung von Ku70 in M1-stimulierten primären humanen Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. Die gezeigten Western Blots von männlichen und weiblichen Individuen stammen von unterschiedlichen Membranen.

B. Statistische Analyse der Acetylierung von Ku70 (n=9, ***p < 0,001) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung.

C. Statistische Analyse der Acetylierung von Ku70 (n=6, **p < 0,01) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung.

3.1.8 Einfluss der Behandlung mit E2 auf die Proteinmenge der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB

Um die Effekte von E2 auf den Proteingehalt der p65-Untereinheit des NFκB zu messen, wurde die Veränderung der Menge der p65-Untereinheit des NFκB mittels Western Blot analysiert. Bei Stimulation mit E2 zeigte sich in weiblichen Makrophagen kein Unterschied in der Proteinmenge der Untereinheit p65 des Proteins NFκB ($p > 0,05$), während in männlichen Makrophagen eine Erhöhung des Proteingehaltes beobachtet werden konnte ($***p < 0,001$, Abb. 12).

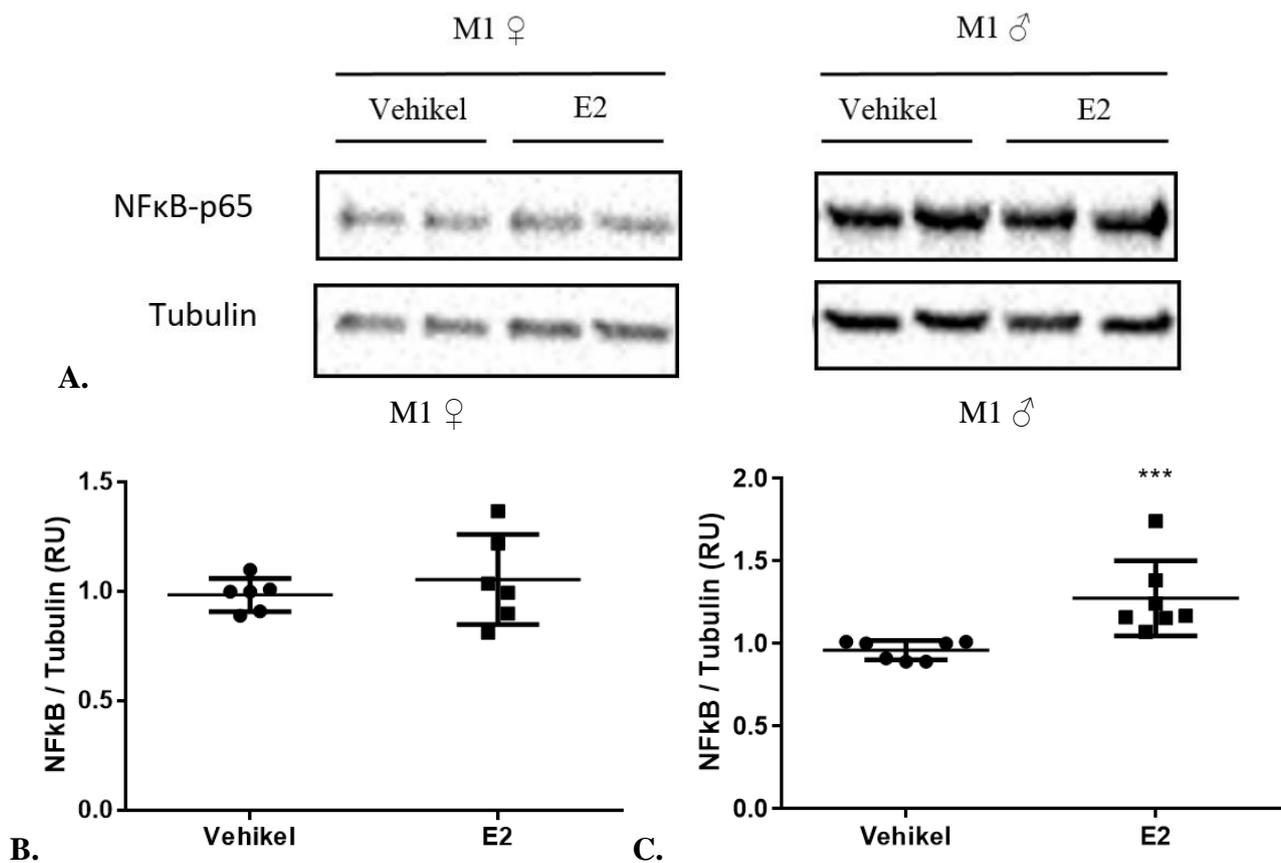


Abbildung 12. Proteinmenge von NFκB-p65 in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen E2 = 17-β-Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse von NFκB-p65 in M1-stimulierten primären humanen Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. Tubulin wurde als Ladungskontrolle genutzt.

B. Statistische Analyse des Proteingehaltes von NFκB-p65 in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung (n=6, $p > 0,05$).

C. Statistische Analyse des Proteingehaltes von NFκB-p65 in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung (n=7, $***p < 0,001$).

3.1.9 Einfluss der Behandlung mit E2 auf den mRNA-Gehalt von Entzündungsmediatoren

Der Einfluss einer Behandlung mit E2 auf die Expression von Sirt1-abhängigen Entzündungsmediatoren in primären humanen M1-polarisierten Makrophagen erfolgte mittels qPCR. Sowohl in weiblichen als auch in männlichen M1-Makrophagen zeigte sich kein Unterschied in der m-RNA-Expression der M1-spezifischen Entzündungsmediatoren IL-1 β und CD80. In weiblichen, nicht jedoch in männlichen Makrophagen zeigte sich ein signifikanter Abfall der TNF-alpha-Expression bei Behandlung mit E2 (Abb. 13 A + B).

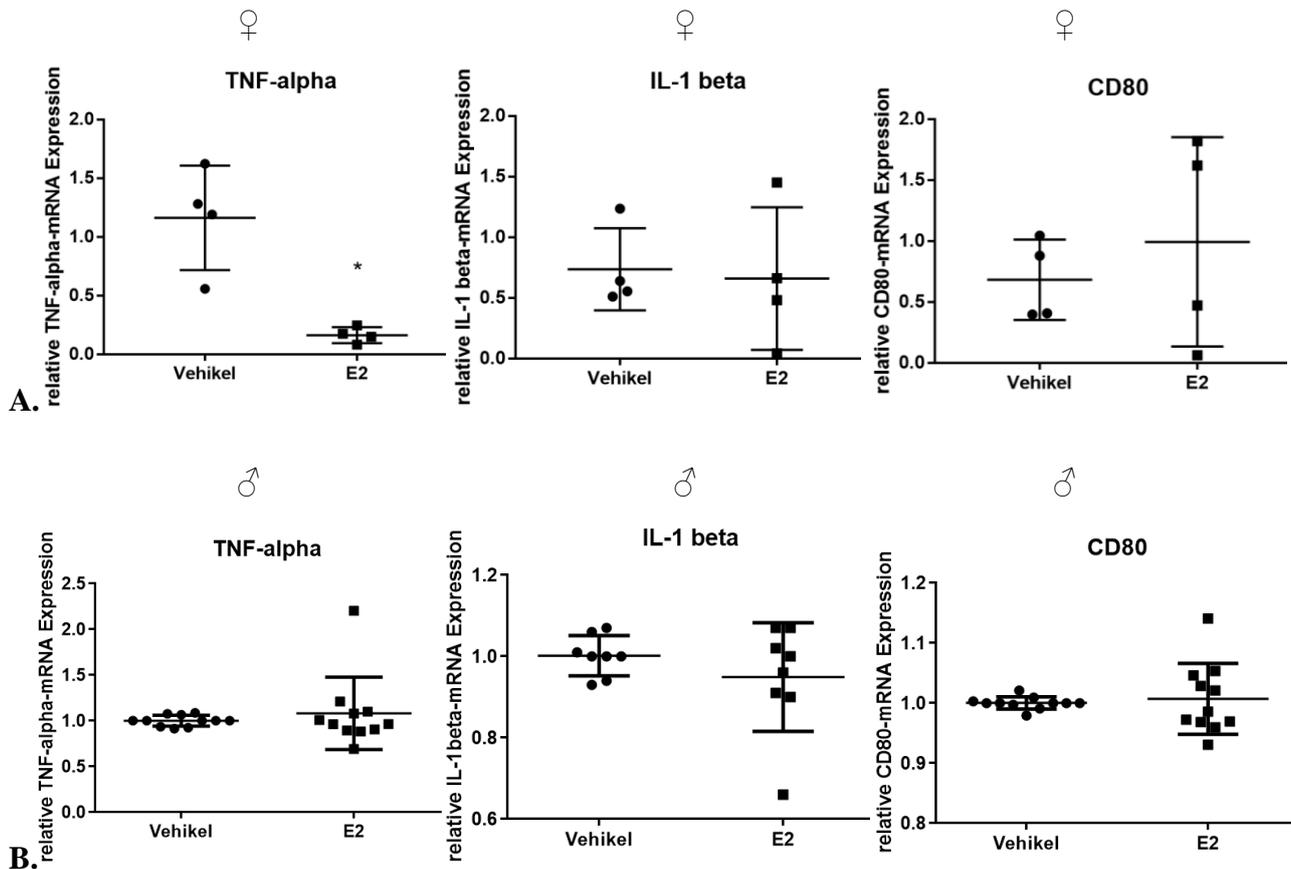


Abbildung 13. Einfluss der Behandlung mit E2 auf den mRNA-Spiegel von Entzündungsmediatoren in weiblichen und männlichen primären humanen M1-Makrophagen

E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Statistische Analyse der relativen Expression der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β und CD80 (n=4, p* < 0,05) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen.

B. Statistische Analyse der relativen Expression der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β und CD80 (n=8-11, p > 0,05) in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen.

Die Proben wurden als biologische und technische Duplikate aufgetragen. HPRT wurde als Ladungskontrolle genutzt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.2 Einfluss von E2 auf Sirt1 in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle

Zur Bestimmung des Östrogeneinflusses auf die Lokalisation von Sirt1 wurde eine Trennung der Zellkompartimente in Nukleus und nukleus-freies Kompartiment durchgeführt. Hierzu wurde die humane Monozyten-Zelllinie THP1 verwendet, da die von Ethikkommission zugelassene Blutmenge für eine Isolation der nukleären Fraktion von primären humanen Zellen nicht ausreichend war. Die humane monozytäre Zelllinie THP1 stammt aus einem einjährigen männlichen Leukämie-Patienten.

3.2.1 Nachweis der erhöhten Phosphorylierung von ERK nach Behandlung mit E2

Es ist bekannt, dass Östrogen ERK durch Phosphorylierung aktiviert. Um den Effekt der Behandlung mit E2 nachzuweisen, wurde das Verhältnis pERK / ERK mittels Western Blot analysiert. Bei einer Langzeit-Behandlung der männlichen THP1-Zellen zeigte sich in M0-Monozyten eine deutliche Zunahme der ERK-Phosphorylierung und damit Aktivität (* $p < 0,01$), während die ERK-Phosphorylierung in M1-Makrophagen unverändert blieb ($p > 0,05$) (Abb. 14).

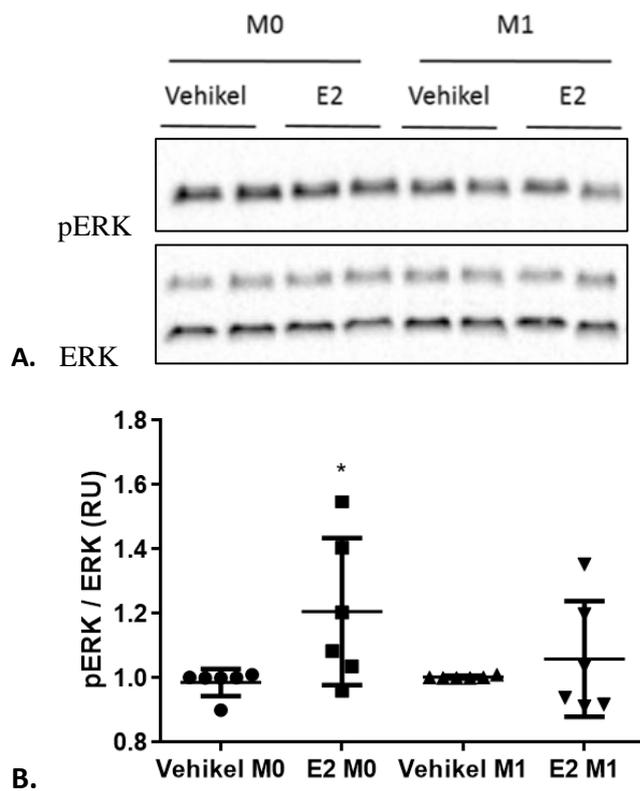


Abbildung 14. ERK-Proteingehalt und -Aktivität in M0- und M1-polarisierten THP1-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit E2

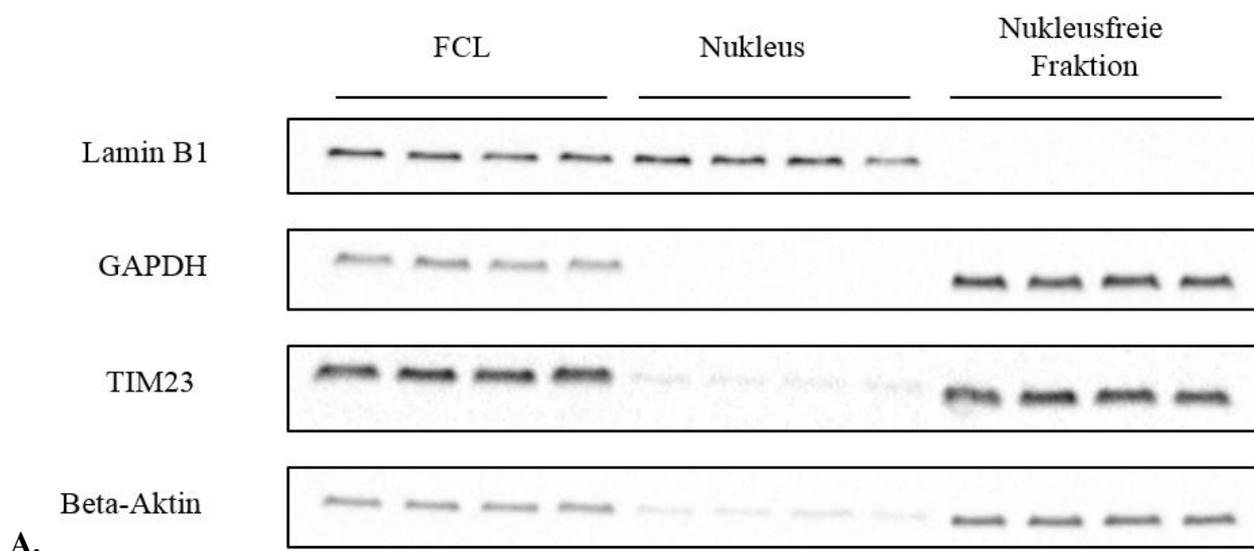
E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse von pERK und ERK in M0- und M1-polarisierten THP1-Zellen nach 24 h Behandlung mit E2. Tubulin wurde als Ladungskontrolle genutzt.

B. Statistische Analyse der ERK-Aktivität (pERK zu ERK, $n=6$, * $p < 0,05$) in M0- und M1-polarisierten THP1-Zellen, behandelt mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.2.2 Nachweis der Isolation von reinen intakten Kernen und der nukleusfreien Fraktion aus THP1-Zellen

Um das Protokoll zur Isolation von reinen intakten Kernen und nukleusfreier Fraktion zu überprüfen, wurde nach jeder Nukleusisolation eine Kontrolle der Reinheit der isolierten Fraktionen durchgeführt. In der nukleusfreien Fraktion konnte kein Lamin B1 als nukleärer Marker nachgewiesen werden, das mitochondriale Protein TIM23 und das Zytoskelettprotein Beta-Aktin waren in der nukleusfreien Fraktion vorhanden. Die Reinheit der nukleären Fraktion ließ sich durch ein Fehlen des Proteins GAPDH nachweisen. Des Weiteren konnte das mitochondriale Protein TIM23 und das Zytoskelettprotein Beta-Aktin nicht in der nukleären Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 15). Im Vollzelllysat (FCL) waren alle analysierten Proteine vorhanden.



A.

Abbildung 15. Proteinmenge in THP1-Zellen nach Isolation von reinen intakten Kernen und der nukleusfreien Fraktion
Western Blot-Analyse der Proteine Lamin B1, GAPDH, TIM23 und Beta-Aktin im FCL, Nucleus und in der nukleusfreien Fraktion.

3.2.3 Nachweis der Eignung des Protokolls zur Nukleusisolation zur Bestimmung der Acetylierungsänderung

Um zu überprüfen, ob sich nach dem Protokoll zur Nukleusisolation eine Acetylierungsänderung nachweisen lässt, wurden der Nucleus und die nukleusfreie Fraktion aus Sirt3-Knockout-HAP-1-Zellen und den nativen HAP-1 isoliert. Während sich im FCL in beiden Zellen der gleiche Acetylierungsgrad nachweisen ließ, zeigten die Sirt3-Knockout-Zellen eine erhöhte Acetylierung von p53 im Nucleus und einen verminderten Acetylierungsgrad in der nukleusfreien Fraktion. In nativen

HAP-1- Zellen zeigte sich eine verminderte p53-Acetylierung im Nukleus und eine im Vergleich zur Sirt-3-Knockout-Zelle deutlich erhöhte Acetylierung von p53 in der der nukleusfreien Fraktion (Abb. 16).

Auch hier wurde der Nachweis der Reinheit der Fraktionen erbracht. Die nukleäre Fraktion ist nicht mit zytosolischen Bestandteilen verunreinigt, da das zytoplasmatische Protein GAPDH und das Protein PDI, welches im endoplasmatischen Retikulum vorkommt, in der nukleären Fraktion nicht nachweisbar waren (Abb. 16).^{112,113} In Westernblot-Analysen wurde gezeigt, dass es sich bei der isolierten Nukleusfraktion um reine intakte Kerne handelt, gemessen anhand der Menge des Proteins Lamin B1.

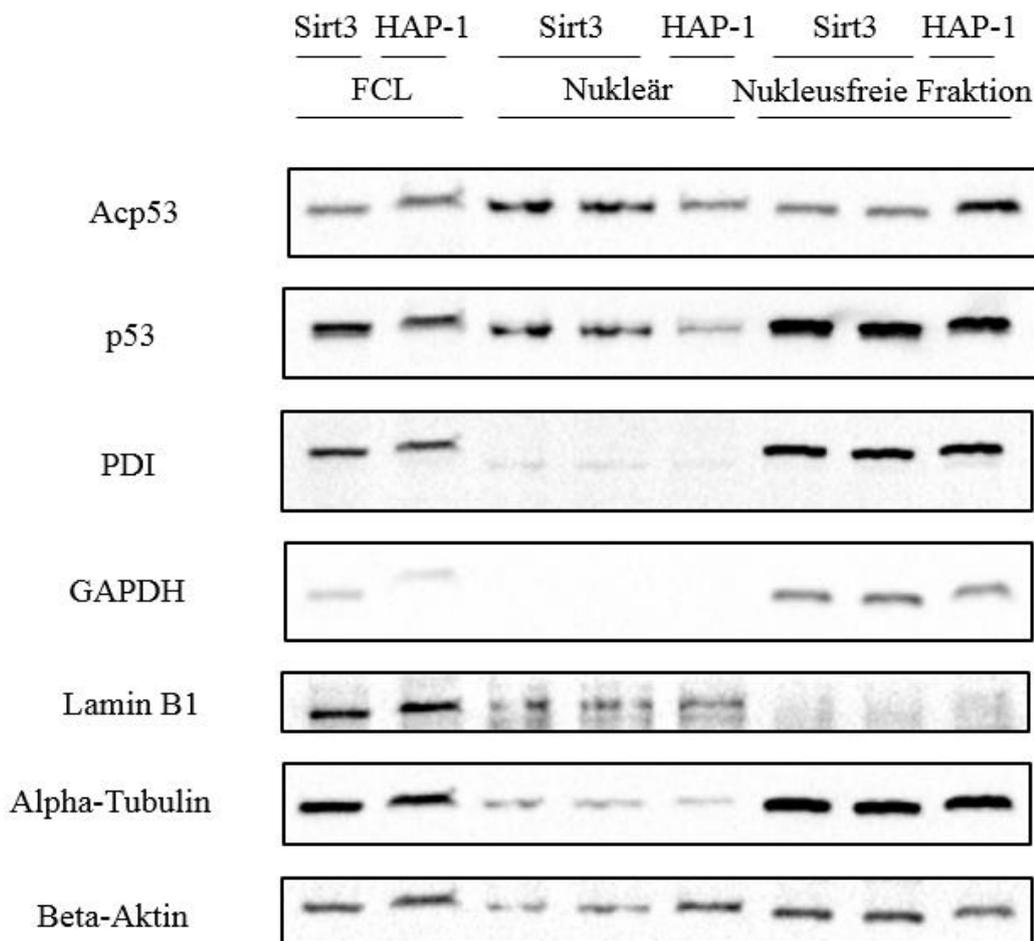
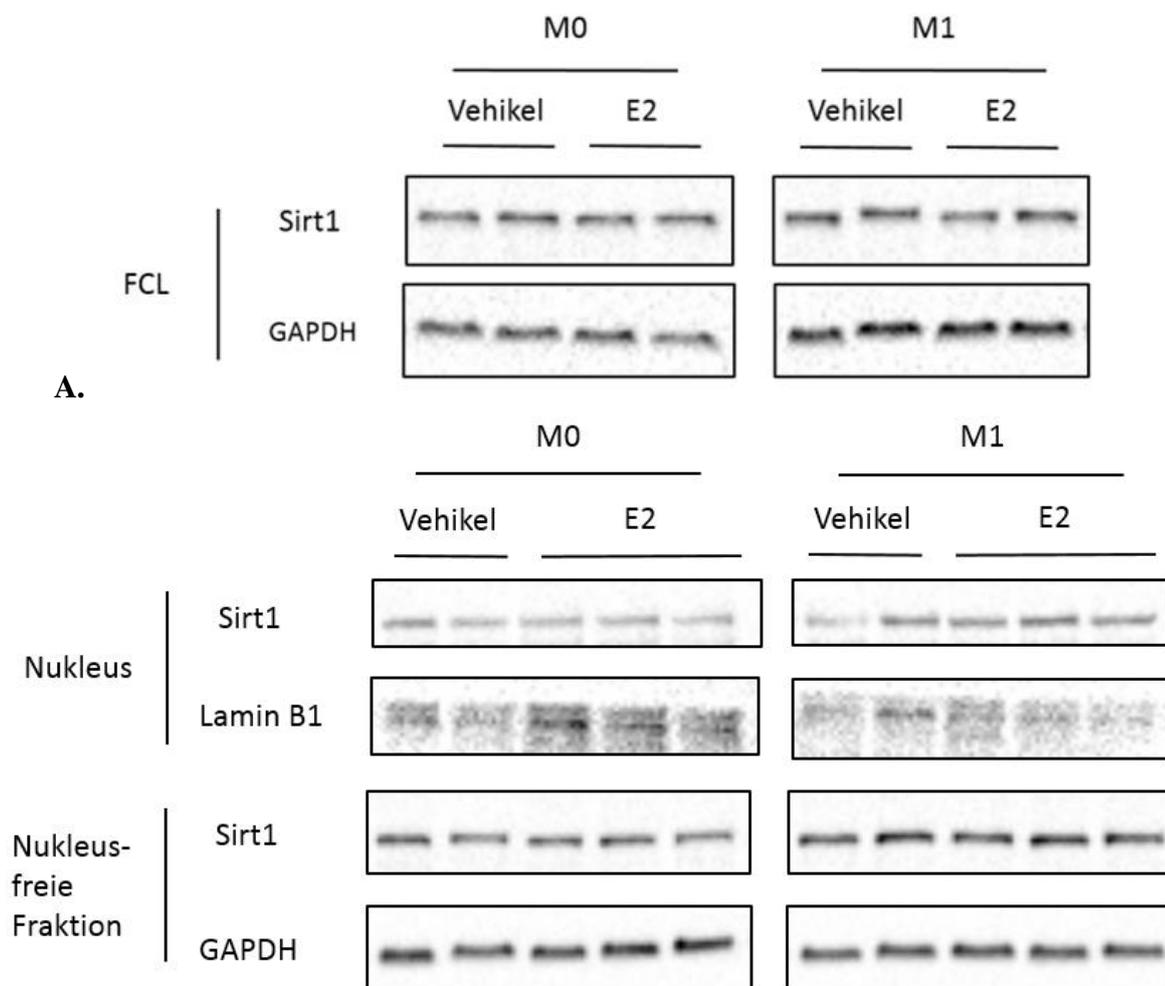


Abbildung 16. Proteinmenge in THP1-Zellen nach Isolation von reinen intakten Kernen und der nukleusfreien Fraktion
Western Blot-Analyse der Proteine Acp53, p53, PDI, GAPDH, Lamin B1, Alpha-Tubulin und Beta-Aktin im FCL, Nukleus und in der nukleusfreien Fraktion in Sirt3-Knockout-HAP-1-Zellen und nativen HAP-1-Zellen.

3.2.4 Effekte der ER-Aktivierung auf den Sirt1-Proteingehalt in der nukleären und nukleusfreien Fraktion sowie im Vollzellsatz von THP1-Makrophagen

Um die Effekte von E2 auf den Gehalt an Sirt1-Protein in der nukleären und nukleusfreien Fraktion zu untersuchen, erfolgte eine Isolation reiner intakter Kerne und eine anschließende Analyse mittels Western Blot. Es konnten keine Auswirkungen von E2 auf die Sirt1-Menge im Vollzellsatz beobachtet werden ($p > 0,05$) (Abb. 17 B). Jedoch zeigte sich eine Halbierung der Sirt1-Menge in der Nukleusfraktion von M0-THP1-Monozyten (** $p < 0,01$), wohingegen M1-stimulierte THP1-Zellen keinen Unterschied in der nukleären Sirt1-Menge zeigten ($p > 0,05$) (Abb. 17 C). In der nukleusfreien Fraktion konnte kein Unterschied in M0-THP1-Monozyten und M1-Makrophagen beobachtet werden ($p > 0,05$) (Abb. 17 D).



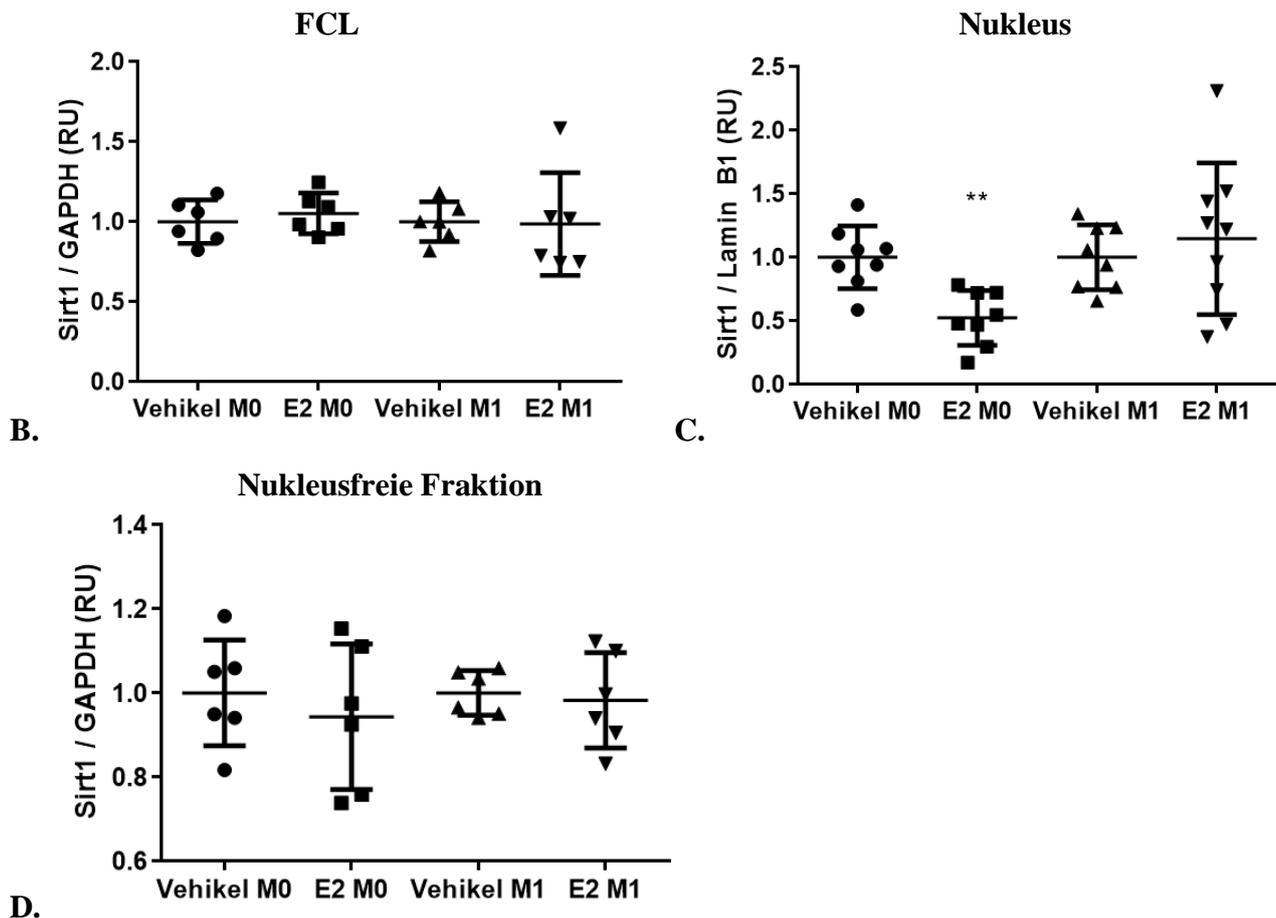


Abbildung 17. Sirt1-Proteingehalt in THP1-Makrophagen
 E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse von Sirt1 in THP1-Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. GAPDH wurde als Ladungskontrolle genutzt. Die Western Blots stammen von einer Membran.

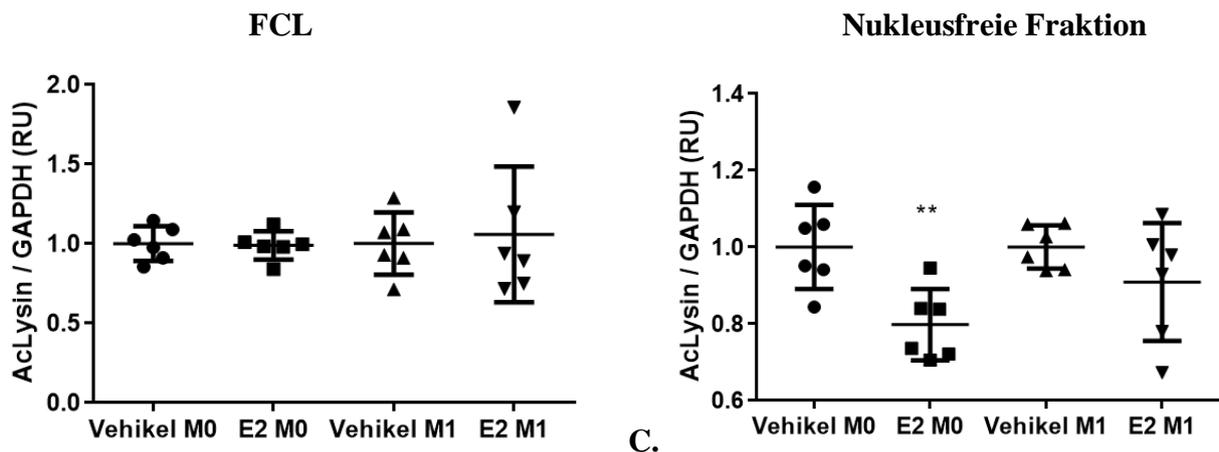
B. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge im Vollzellslysate von THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6, $p > 0,05$).

C. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge in der Nucleusfraktion der THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=8, $**p < 0,001$).

D. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge in der nukleusfreien Fraktion der THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6, $p > 0,05$).

3.2.5 Effekte der ER-Aktivierung auf die Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion und im Vollzellslysate von THP1-Makrophagen

Im Vollzellslysate zeigte sich kein Unterschied in der Lysinacetylierung nach Stimulation mit E2 ($p > 0,05$) (Abb. 18). In der nukleusfreien Fraktion hingegen war eine Erniedrigung der Acetylierung von Lysin in M0-THP1-Monozyten zu verzeichnen ($**p < 0,01$, siehe Abbildung 18), jedoch kein Unterschied in M1-stimulierten THP1-Zellen ($p > 0,05$).



B.

C.

Abbildung 18. Acetylierung von Lysin in THP1-Makrophagen

E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

A. Western Blot-Analyse der Acetylierung von Lysin in THP1-Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. GAPDH wurde als Ladungskontrolle genutzt. E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle

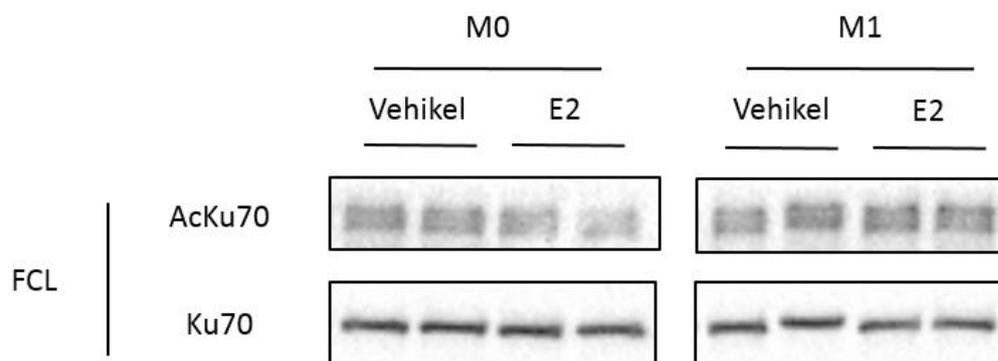
B. Statistische Analyse der Acetylierung von Lysin im Vollzelllysat von THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6, $p > 0,05$).

C. Statistische Analyse der Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion der THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6, $**p < 0,001$).

3.2.6 Effekte der ER-Aktivierung auf die Acetylierung von Ku70 in der nukleären Fraktion und im Vollzelllysat von THP1-Makrophagen

Im Vollzelllysat zeigte sich kein Unterschied in der Acetylierung von Ku70 in M0-THP1-Zellen, jedoch eine 30-prozentige Steigerung der Acetylierung von Ku70 in M1-Makrophagen ($*p < 0,05$) (Abb. 19 B). In der Nukleusfraktion hingegen konnte nahezu eine Verdopplung Ku70-Acetylierung nach Stimulation mit E2 in beobachtet werden ($*p < 0,05$), wohingegen M1-Makrophagen keinen Unterschied zeigten ($p > 0,05$) (Abb. 19 C).

A.



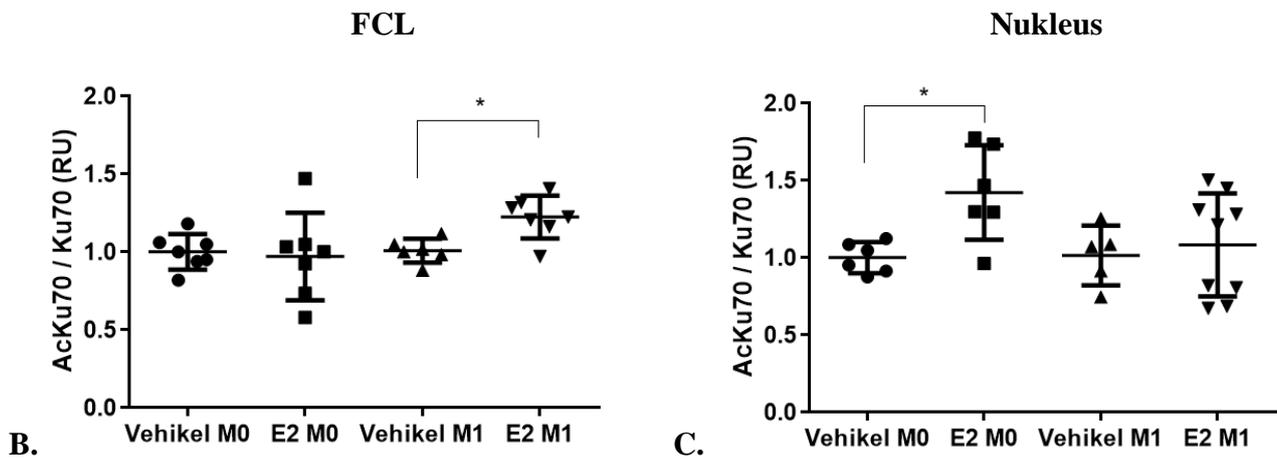
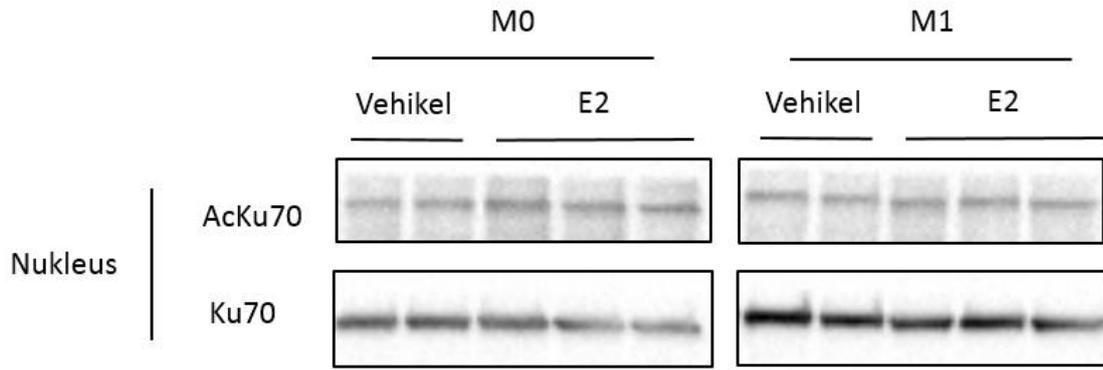


Abbildung 19. Acetylierung von Ku70 in THP1-Makrophagen
 E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle, RU = *Relative Units* (Relative Einheiten)

- A.** Western Blot-Analyse der Acetylierung von Ku70 in THP1-Makrophagen, nach 24 h Behandlung mit E2. GAPDH wurde als Ladungskontrolle genutzt. E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle
- B.** Statistische Analyse der Acetylierung von Ku70 im Vollzellysate von THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=7, *p < 0,05).
- C.** Statistische Analyse der Acetylierung von Ku70 in der Nukleusfraktion der THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6, *p < 0,05).

4 Diskussion

4.1 Wichtigste Ergebnisse der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Östrogen einen Einfluss auf die Sirt1-Proteinmenge und -Aktivität in humanen Makrophagen hat. *Erstens*, führte eine Stimulation mit E2 zu einer Verminderung der nukleären Sirt1-Proteinmenge von humanen Monozyten. *Zweitens*, stieg durch eine Stimulation mit E2 die Acetylierung des nukleären Proteins p53 in weiblichen Makrophagen und des nukleären Proteins Ku70 in beiden Geschlechtern an, während die Acetylierung von Lysinresten unverändert blieb. Die Proteinmenge der Sirt1-abhängigen p65-Untereinheit des NFκB-Komplexes hingegen war nur in männlichen Makrophagen unter E2-Exposition gesteigert, nicht jedoch in weiblichen Makrophagen. *Drittens*, zeigten sich unter E2-Exposition keine Unterschiede in der mRNA-Expression der M1-spezifischen Entzündungsmediatoren IL-1β und CD80 bei beiden Geschlechtern, jedoch ein signifikanter Abfall der TNF-alpha-Expression in weiblichen Makrophagen.

4.2 Validierungsexperimente

In Validationsexperimenten wurde die Eignung der primären humanen Makrophagen für die Nutzung zur Klärung der Fragestellung dieser Arbeit bewiesen. Primäre humane Makrophagen ließen sich durch Zugabe von LPS und IFN-γ zu M1-Makrophagen polarisieren, die eine hohe Adhärenz zeigten sowie eine erhöhte mRNA-Expression der M1-spezifischen Entzündungsmediatoren TNF-α, IL-1β und CD80-mRNA-Expression. Aus der Literatur sind diese Art der Differenzierung sowie das Spektrum an M1-spezifischen Markern hinreichend bekannt.^{17,114-117}

Um den Effekt von Östrogen auf den Gehalt des Proteins Sirt1 in humanen Makrophagen zu ergründen, war zunächst der Nachweis des Vorhandenseins von Östrogenrezeptoren nötig. Die Östrogenrezeptoren ERα, ERβ und GPR30 konnten bereits in mehreren Studien in primären humanen Makrophagen nachgewiesen werden.^{46,47,118-120} Andere Studien hingegen konnten zeigen, dass in humanen PBMCs nur die Östrogenrezeptoren ERα-36 und GPR-30 vorhanden sind, nicht jedoch die anderen ER-α-Subtypen und ER-β.¹¹⁹

Die Westernblot-Analyse der primären humanen Makrophagen der vorliegenden Arbeit zeigte einen erhöhten Gehalt aller Östrogenrezeptoren in weiblichen M1-Makrophagen verglichen mit männlichen Makrophagen. Die meisten publizierten Studien zeigen keine geschlechterspezifischen Unterschiede im Proteingehalt der Östrogenrezeptoren.¹¹⁹ In der kritischen Periode für die

geschlechterspezifische Gehirnentwicklung in der mittleren Gestationsperiode konnte eine erhöhte Menge von ER α im Gehirn von weiblichen Schafen beobachtet werden.¹²¹ Auch in Mäusen zeigte sich eine höhere Menge des ER α in weiblichen als in männlichen Tieren.¹²² Die höhere Menge von ER α im Vergleich zu ER β in M1-polarisierten Makrophagen deckt sich mit Studien von Murphy et al.¹¹⁸

Nach einer Langzeitbehandlung mit E2 über 24 h konnte ein erhöhtes pERK / ERK-Verhältnis (ERK-Aktivierung) in M1-Makrophagen beider Geschlechter nachgewiesen werden. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass E2 und andere Steroide verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden initiieren, wie beispielsweise die MAPKs und insbesondere die ERKs¹²³. Pinceti et al. konnten zeigen, dass eine Langzeit-Behandlung mit E2 über Wochen die Aktivität von ERK in ovariectomierten Ratten steigert.¹²⁴ Nach einer Ovariectomie konnte über Wochen eine verminderte E2-Konzentration und auch eine verminderte ERK-Aktivität nachgewiesen werden.¹²⁵

4.3 Experimente zum Östrogen-Einfluss auf Sirt1 und dessen Zielproteine

Um die Auswirkungen einer Östrogenstimulation auf den Proteingehalt und die Aktivität von Sirt1 in humanen Makrophagen im Entzündungsvorgang zu untersuchen, wurden in einem ersten Schritt primäre humane M1-stimulierte Makrophagen mit E2 behandelt. Die klassisch aktivierten M1-Makrophagen spielen als pro-inflammatorische Zellen im Entzündungsprozess eine wichtige Rolle.¹²⁶⁻¹²⁸ Eine Studie von Toniolo et al. zeigte an undifferenzierten PBMCs eine Erniedrigung der Sirt1-Proteinmenge im Vollzelllysat humaner PBMCs bei 24-stündiger Behandlung mit E2, ebenso wie eine Erniedrigung der Menge des Proteins Sirt1 in glatter Gefäßmuskulatur von Ratten⁸⁸, während bei den Versuchen der vorliegenden Doktorarbeit keine Änderung des Sirt1-Proteingehaltes im Vollzelllysat zu verzeichnen ist. Die beschriebenen Versuche von Toniolo et al. wurden an undifferenzierten PBMCs durchgeführt und somit sind hier viele Zelltypen enthalten, die sich bei einer Exposition mit E2 anders verhalten könnten als primäre humane M1-Makrophagen und die Divergenz der Ergebnisse erklären könnten.

Bisher existieren nur wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von E2 auf die Sirt1-Proteinmenge in humanen Zellen auseinandersetzen. In unserer Arbeitsgruppe konnte an weiblichen primären humanen umbilikalen venöse Endothelzellen (HUVECs) einen verminderten Proteingehalt von Sirt1 im Vollzelllysat mit konsekutiver Erhöhung der Acetylierung des nukleären Proteins p53 gezeigt werden (Barcena de Arellano et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Auch Studien an weiblichen glatten Gefäßmuskelzellen konnten eine Herunterregulierung der Sirt1-Proteinmenge bei Zugabe von

17- β -Östradiol beobachten, gefolgt von einer Steigerung der Apoptose sowie reduzierter Proliferation, mediiert durch den Akt- und ERK-Signalweg.⁹⁵

Je nach Zelltyp oder Gewebe kann E2 unterschiedliche Wirkungen zeigen. Neuste Studien zeigen eine Sirt1-abhängige Reaktion auf eine 17 β -Estradiol-Exposition. In glatten Muskelzellen der Atemwege von Mäusen konnte nach E2-Gabe eine Herunterregulation von Sirt1 beobachtet werden sowie eine erhöhte Zellschädigung.¹²⁹ Auf der anderen Seite zeigte sich, dass E2 in neonatalen Ratten über eine Aktivierung von Sirt1 und einer Deacetylierung von p53 vor oxidativem Stress, Neurodegeneration und Neuroinflammation schützt.¹³⁰ In Kardiomyozyten konnte E2 über eine Hochregulierung von Sirt1 vor Schäden schützen.¹³¹

In humanen Brustkrebszellen führt E2 zu einer Überexprimierung von Sirt1.⁹¹ Brustkrebszellen jedoch haben einen radikal veränderten Stoffwechsel, der stark von den Verhältnissen in humanen Makrophagen differiert, was die gegensätzliche Reaktion auf E2 erklären könnte. Im Mausmodell zeigt sich bei Stimulation mit E2 von Knochenmarksmakrophagen eine Erhöhung der Sirt1-Proteinmenge im Vollzellysat.⁹⁴ Diese gegensätzliche Reaktion könnte daraus resultieren, dass es sich um Knochenmarksmakrophagen handelt und dass sich der murine Stoffwechsel vom humanen unterscheidet. Wie bereits oben eingehend beschrieben vermittelt E2 in unterschiedlichen Geweben Sirt1-abhängig unterschiedliche Funktionen^{88,131,132}, was ursächlich für die genannten Unterschiede sein könnte.

In weiblichen M1-Makrophagen konnte bei Behandlung mit E2 eine erhöhte Acetylierung von p53 und Ku70 beobachtet werden, während sich in männlichen Makrophagen eine Erhöhung der Acetylierung von Ku70, jedoch keine signifikante Veränderung der Acetylierung von p53 zeigte. Geschlechterunterschiede in der Mutationsrate von p53 sind beispielsweise bereits aus der Krebsforschung bei kleinzelligem Lungenkarzinom bekannt, welche in Frauen geringer ist als in Männern.¹³³ Viele Studien an Tiermodellen konnten zeigen, dass eine Verminderung der Sirt1-Proteinmenge zu einer erhöhten Acetylierung von p53¹³⁴⁻¹³⁶ und Ku70^{97,137} führt. Eine Inaktivierung von Sirt1 führt in einer humanen Tumorzelllinie zur vermehrten p53-Acetylierung.¹³⁴ Somit können die erhöhte Acetylierung von p53 und Ku70 durch eine Absenkung der Sirt1-Menge verursacht sein.

In der vorliegenden Doktorarbeit blieb die Acetylierung von Lysin in primären humanen Makrophagen unbeeinflusst von der Stimulation mit E2. Die Messung der Lysin-Acetylierung umfasst zytosolische, nukleäre und mitochondriale Proteine und kann nicht nur durch Sirtuine,

sondern auch durch andere Deacetylasen oder Acetyltransferasen beeinflusst werden, während die Acetylierung nukleärer Proteine wie Histone, p53 und Ku70 hauptsächlich durch Sirtuine und Histonacetyltransferasen beeinflusst wird.^{138,139} Sirt1 beeinflusst nur eine geringe Anzahl an Proteinen, die fast durchgehend nukleär vorkommen.^{98,137,140} Andere Deacetylasen und Acetyltransferasen regulieren die Acetylierung von Proteinen, die sowohl im Nukleus als auch in anderen Kompartimenten vorkommen.^{141,142} Somit können die nukleären östrogenbedingten Sirt1-abhängigen Effekte durchaus von der Acetylierung der Proteine in den restlichen Kompartimenten überlagert sein und sich die Gesamtacetylierung der Lysinreste erhöht zeigen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Stimulation mit E2 sich in männlichen Makrophagen eine Erhöhung der Proteinmenge der Untereinheit p65 des Proteins NFκB.

Östrogene schwächen die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen ab, wie beispielsweise IL-6 und TNF-α.¹⁴³⁻¹⁴⁶ 17-β-Estradiol inhibiert die durch LPS induzierte inflammatorische IL-6-Antwort. Dies resultiert in einer Inhibition der transkriptionellen Aktivität von NF-κB. Dongqi Xing et al konnten zeigen, dass in weiblichen Ratten die Modulation des NFκB-Signalweges durch E2 über eine Steigerung des NFκB-Inhibitors IκBα-Levels stattfindet und damit die p65-Bindung an den Promoter inflammatorischer Gene verhindert.¹⁴⁷ In prämenopausalen weiblichen PBMCs konnte eine verminderte NF-κB-Aktivierung unter Stimulation mit E2 beobachtet werden vermittelt durch die Inhibition der IκBα-Phosphorylation und -Degradation, was in einer verminderten nukleären Translokation von p65 resultiert.¹⁴⁸ Stice et al. zeigten eine erhöhte Aktivierung von NFκB durch E2 in adulten männlichen Koronararterien-Endothelzellen.¹⁴⁹ Eine Stimulation mit E2 führt somit eher zu einer Erhöhung der Proteinmenge der Untereinheit p65 des Proteins NFκB in männlichen, nicht jedoch in weiblichen Makrophagen. Die unterschiedliche E2-Reagibilität von weiblichen und männlichen Zellen könnte in der geschlechterspezifischen Menge von ER begründet liegen.^{119,150}

Auch in der PCR-Analyse der mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren der vorliegenden Arbeit zeigten sich geschlechterspezifische Unterschiede: In männlichen Makrophagen sinken bei einer Stimulation mit E2 die Entzündungsmediatoren weniger stark ab als in weiblichen Makrophagen, beispielsweise die TNF-α-Expression. Dies deckt sich mit Studien, die nachweisen konnten, dass E2 bei Männern eher pro-entzündlich wirkt, während es in weiblichen Zellen E2 eher antientzündlich wirkt.^{119,151,152} Studien konnten zeigen, dass die Serum-TNF-α-Level in prämenopausalen Frauen niedriger sind als in Männern und postmenopausalen Frauen¹⁵³, und dass

die TNF- α -Level in weiblichen Patienten mit septischem Schock erniedrigt sind im Vergleich mit männlichen Patienten¹⁵⁴.

Die Ergebnisse aus der PCR-Analyse decken sich mit der bereits in Westernblot-Analysen nachgewiesenen Erhöhung des NF κ B-p65 unter Behandlung mit E2. Eine Interaktion zwischen NF κ B-p65 und TNF- α ist bereits aus zahlreichen Studien bekannt¹⁵⁵⁻¹⁵⁷, in der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch keine direkte Interaktion. Die weiblichen Makrophagen zeigen keinen Unterschied im Gehalt des Proteins NF κ B wohl aber bei TNF- α , was bedeuten könnte, dass TNF- α nicht nur durch NF κ B reguliert ist. Auch eine Studie von Greten et al. konnte eine Erhöhung von NF κ B bei unveränderter TNF- α -Expression zeigen.¹⁵⁸ Kein Unterschied zeigte sich in der mRNA-Expression der M1-spezifischen Entzündungsmediatoren IL-1 β und CD80. IL-1 β beispielsweise wird durch das NLRP3-Inflammasom reguliert¹⁵⁹ und könnte deshalb von der Interaktion mit NF κ B unabhängig sein.

4.4 Kompartimentabhängige Ausprägung der Menge des Proteins Sirt1 und von dessen Zielproteinen

Die an primären humanen Makrophagen durchgeführten Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass E2 keine Änderung der Sirt1-Proteinmenge im Vollzellysat bewirkt, es jedoch zu einer Erhöhung der Acetylierung der Sirt1-Zielproteine p53 und Ku70 kommt. Es ist bekannt, dass Sirt1 zwar nukleär und zytosolisch vorkommt, aber hauptsächlich nukleär aktiv ist.^{51,52,54,160} Die dynamischen Shuttle-Mechanismen sind angesichts der vielfältigen Funktion von Sirt1 zur Deacetylierung und Modifikation von Proteinen notwendig, um die zellulären Prozesse effizient zu regulieren.¹⁶¹

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, ob ein kompartimentabhängiger Einfluss von E2 auf die Menge des Proteins Sirt1 besteht und ob dies im Einklang mit der Erhöhung der Acetylierung der Sirt1-Zielproteine steht.

Für diese weiterführenden Experimente wurde die humane männliche Monozyten-Zelllinie THP1 verwendet, da die von Ethikkommission zugelassene Blutmenge für eine Isolation der nukleären Fraktion von primären humanen Zellen nicht ausreichend war. THP1-Zellen konnten durch Zugabe von LPS und IFN- γ zu M1-ähnlichen-Makrophagen differenziert werden, wie unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit Prof. Phillip Stawowy (Deutsches Herzzentrum Berlin) zeigen konnte (Barcena de Arellano et al, The impact of the PCSK-9 / VLDL-Receptor axis on inflammatory cell Polarization, eingereichte Publikation).

Das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren in THP1-Zellen ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.^{162,163} Eine 24-stündige Stimulation von THP1-Zellen mit E2 führte zu einem erhöhten Verhältnis von pERK / ERK in humanen M0-ähnlichen Makrophagen, nicht aber in humanen M1-ähnlichen Makrophagen. Dass die M1-ähnlichen Makrophagen bereits in ihrem Grundzustand höher entzündlich sind,¹²⁶⁻¹²⁸ wäre ein möglicher Grund dafür, dass die Zellen auf eine Stimulation mit E2 nicht mit einer Erhöhung des Verhältnisses von pERK / ERK reagiert haben. Für die weiteren Versuche wurden beide (M0-ähnliche und M1-ähnliche) Makrophagen betrachtet, um die Unterschiede im Zusammenhang mit einer Reaktion auf Stimulation mit E2 zu ergründen.

Um den Einfluss von Östrogen auf den Proteingehalt und die Funktion von Sirt1 in Abhängigkeit von den Zellkompartimenten zu ergründen, wurde eine Trennung der Zellkompartimente in Nukleus und nukleus-freies Kompartiment an THP1-Zellen durchgeführt. Für die Nukleusisolation wurde das Nature Protokoll von Rosner et al. verwendet.¹¹¹ In Validationsexperimenten konnte die Eignung des Protokolls zur Bestimmung einer Acetylierungsänderung in humanen Makrophagen nachgewiesen werden.

Wie schon in den primären humanen Makrophagen konnte auch in den THP1-Zellen unabhängig vom Zellkompartiment keine Veränderung der Sirt1-Proteinmenge nachgewiesen werden. Da sich in diesen Zellen unabhängig vom Kompartiment keine Veränderung der Sirt1-Proteinmenge zeigte, liegt nahe, dass der Effekt auf eine Erhöhung anderer Acetylasen bzw. einer Verminderung anderer Deacetylasen zurückzuführen sein könnte. Beispielsweise zu nennen wären hier das CREB-binding protein (CBP) oder HDAC6.^{164,165}

Da in dieser Arbeit in den M0-THP1-Monozyten nach 24 h Östrogen-Effekte nachgewiesen werden konnten, wurde auch hier die Sirt1-Proteinmenge und -Aktivität kompartimentabhängig genauer untersucht. Auch in den M0-THP1-Monozyten konnte im Vollzelllysat keine Veränderung der Sirt1-Proteinmenge nachgewiesen werden. In der Nukleusfraktion zeigte sich eine Halbierung der Sirt1-Proteinmenge, während in der nukleusfreien Fraktion keine Änderung der Sirt1-Proteinmenge nachweisbar war. Die Ergebnisse legen nahe, dass E2 maßgeblich an der Veränderung der Sirt1-Proteinmenge beteiligt ist, da nur die E2-reagiblen M0-THP1-Makrophagen eine Reduktion der Sirt1-Proteinmenge zeigen, während es bei den nicht-reagiblen M1-Makrophagen zu keiner Änderung der Sirt1-Proteinmenge kommt. Die M0-THP1-Zellen zeigen somit ähnliche Effekte wie die im ersten Abschnitt der Arbeit untersuchten primären humanen M1-Makrophagen. Die Menge des nukleären Proteins p53 konnte in der THP1-Zelllinie nicht untersucht werden, da diese p53-defizient sind.¹⁶⁶

Dass Östrogen im Nukleus der Zellen wirkt, ist aus zahlreichen Studien hinreichend bekannt. An Brustkrebs-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass ER α in Zellen, die in Gegenwart von E2 wachsen, hauptsächlich im Nukleus exprimiert ist.^{60,167} Jedoch konnte auch an der Zelloberfläche und im Zytoplasma ER α mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.¹⁶⁸ Immunpräzipitationsstudien von Elangovan konnten zeigen, dass in ER α -positiven Zelllinien Sirt1 und ER α im Nukleus colokalisiert sind.⁹¹ Aus diesem Grund könnte sich die Östrogeneffekte auf Sirt1 vorwiegend im Nukleus zeigen.

In M0-THP1-Zellen lässt sich im Vollzellysat keine Änderung der Acetylierung von Lysin beobachten, es zeigt sich jedoch eine signifikante Absenkung der Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion. Die Änderung des Grades der Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion könnte auf die Aktivität anderer Deacetylasen zurückzuführen sein.^{169,170} Zu den wichtigsten Deacetylasen gehören die Gruppe der Histon-Deacetylasen (HDAC) sowie die Sirtuin-Familie. Die Klassen I, II and IV der Histon-Deacetylasen kommen sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vor und auch die verschiedenen Sirtuine sind in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert und können zwischen Zytosol und Nukleus transloziert werden.¹⁷¹⁻¹⁷³ Sirt1 kommt auch zytosolisch vor, die hauptsächliche Lokalisation ist jedoch im Zellkern.⁵¹⁻⁵³

Die Betrachtung der Acetylierung des nukleären Ku70 hingegen zeigte, wie erwartet, eine Steigerung der Ku70-Acetylierung im Nukleus von humanen M0-THP1-Zellen, wohingegen die Ku70-Acetylierung im Vollzellysat unverändert blieb. Die vermehrte Acetylierung des im Nukleus der M0-THP1-Zellen enthaltenen Ku70 scheint auf einen Effekt des verminderten nukleären Gehaltes von Sirt1 dieser Zellen zurückzuführen sein, denn durch das Fehlen der NAD⁺-abhängigen Deacetylase Sirt1 wird eine verminderte Deacetylierung des nukleären Proteins bewirkt.^{97,137}

Sirt1 kann als Protein mittels eines nukleären Exportsignals zwischen dem Nukleus und dem Zytosol transferiert werden.⁵⁴ Es ist hauptsächlich nukleär lokalisiert, kommt jedoch auch im Zytosol vor.⁵¹⁻⁵³ Da sich die Proteinmenge von Sirt1 im Vollzellysat und in der kernfreien Fraktion nicht ändert, die nukleäre Proteinmenge an Sirt1 jedoch erniedrigt ist, könnten neben einer Änderung der nukleären Proteinmenge auch die Transportprozesse zwischen Kern und Zytosol betroffen sein. Eine veränderte Proteinverteilung könnte auch die nachgewiesenen Effekte auf die Sirt1-Zielproteine erklären.

4.5 Erkenntnisse der Arbeit

Die Ergebnisse der Versuche nach Stimulation mit E2 in den primären humanen M1-Makrophagen führen zu der Hypothese, dass die vermehrte Acetylierung der nukleären Proteine p53 und Ku70 bei

unveränderter Sirt1-Proteinmenge im Vollzellslysat auf einen verminderten nukleären Gehalt von Sirt1 zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Versuche mit den THP1-Zellen konnten, die bereits aus den Experimenten mit primären Makrophagen gewonnenen Erkenntnisse bestätigen und weiter untermauern.

Graphische Darstellung der Ergebnisse in humanen Makrophagen:

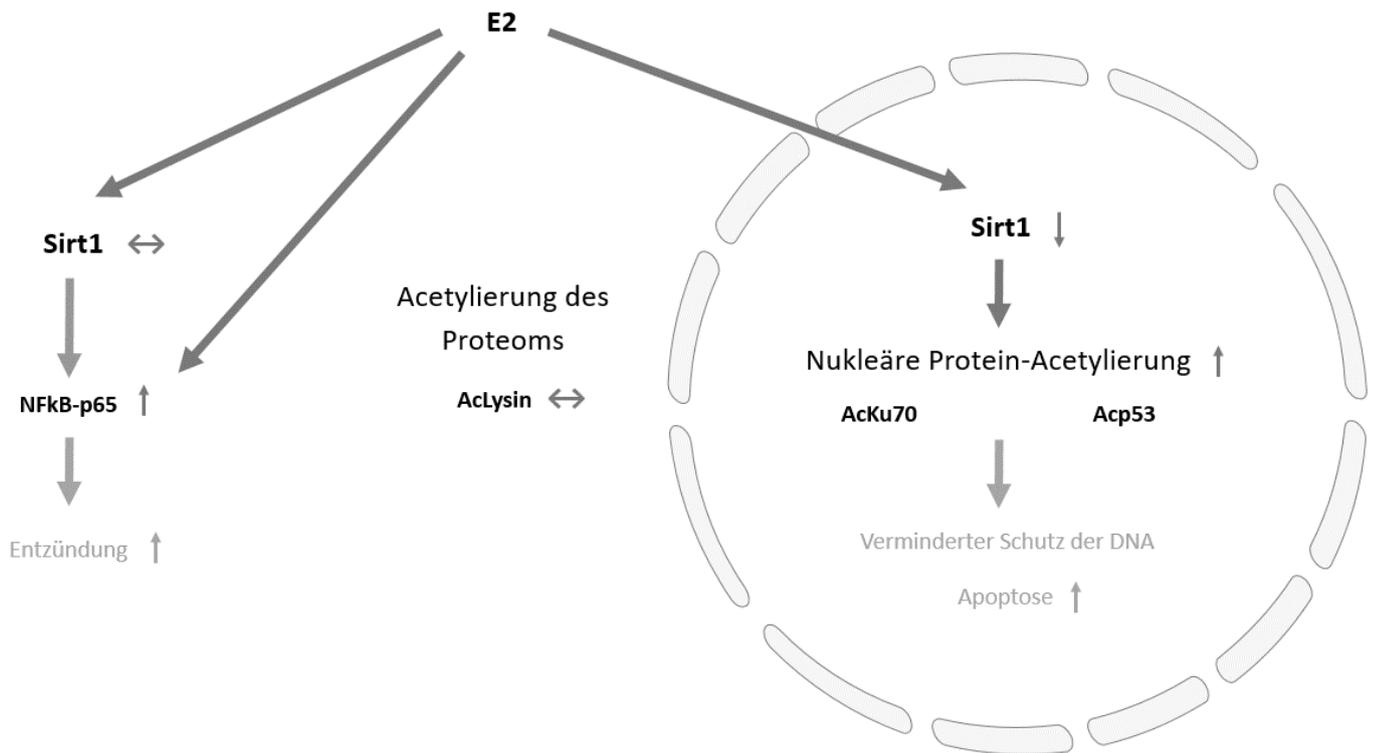


Abbildung 20. Grafische Zusammenfassung der Erkenntnisse der Arbeit

E2 senkt die nukleäre Sirt1-Aktivität und erhöht die nukleäre Proteinacetylierung in humanen Makrophagen. Eine Abnahme der Aktivität der NAD⁺-abhängigen Deacetylase Sirt1 führt zu einer verstärkten Acetylierung nukleärer Proteine wie Acp53 und AcKu70, während sich in der Acetylierung von Lysinresten keine Änderung zeigt. Durch eine verstärkte Acetylierung von nukleären Proteinen kommt es zum verminderten Schutz der DNA und zu einer erhöhten Apoptoserate. Im Zytosol ändert sich der Sirt1-Gehalt nicht, jedoch kommt es zu einer erhöhten Proteinmenge der Untereinheit p65 des NFκB-Komplexes.

Legende:

E2 = 17-β-Estradiol

↑ = erhöhte Proteinmenge

↓ = verminderte Proteinmenge

↔ = unveränderte Proteinmenge

Schwarze Schrift = Durch diese Arbeit bestätigte Ergebnisse

Graue Schrift = Anzunehmende Ergebnisse (weitere Experimente erforderlich)

4.6 Limitationen und methodische Einschränkungen

Bei dieser Arbeit wurden humane Makrophagen aus einer gemischten Zellpopulation im Alter zwischen 19 und 58 Jahren verwendet mit einem Altersmedian von 24 Jahren. Um eine genaue Aussage des Effektes von E2 auf prä- bzw. postmenopausale Frauen und die Auswirkungen der Seneszenz zu treffen, müsste eine Trennung der Ergebnisse nach Altersgruppen erfolgen. Dies war in der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich aufgrund der zu geringen Anzahl an Probanden der postmenopausalen Gruppe, die den Einschlusskriterien entsprachen.

Die Nukleusisolation wurde an der THP1-Zelllinie durchgeführt und nicht an primären humanen Zellen, da aus der von der Ethikkommission zugelassenen Blutmenge nicht genügend Material für die Isolation der nukleären Fraktion zu gewinnen war. Um eine Aussage über den kompartimentabhängigen E2-Einfluss in primären humanen Zellen zu treffen, müssten die Versuche in einem nächsten Schritt an primären humanen Zellen durchgeführt werden. Für die durchgeführten Versuche wurde bereits die von der Ethikkommission maximal zugelassene Blutmenge genutzt. Möglich wäre eventuell auch ein Poolen mehrerer Individuen innerhalb einer Gruppe.

Die Konzentration von E2, die in den *in vitro* Experimenten genutzt wurde, war höher als der normale physiologische E2-Level des menschlichen Körpers, stellt aber eine Hochdosissupplementation von E2 gut dar. Die physiologische Konzentration von Östrogen im Körper differiert von einer basalen Konzentration von 10 pmol/L im humanen Serum bis zu einer Konzentration von 40 nmol/L während der Schwangerschaft.¹⁷⁴ Die verwendete Menge an E2 (10 nmol/L) repräsentiert somit ungefähr das E2-Level während der Schwangerschaft.¹⁷⁵ Die Zellen waren zudem durch die Kultivierung unter Stress gesetzt.

4.7 Ausblick

In den durchgeführten Experimenten konnte eine vermehrte Acetylierung des nukleären Proteins Ku70 bei gleichzeitiger Verminderung der Sirt1-Proteinmenge im Nukleus beobachtet werden sowie eine vermehrte Acetylierung von p53 im Nukleus. Diese Versuche legen nahe, dass die verminderte Sirt1-Konzentration im Nukleus auch in humanen Zellen einen pro-apoptotischen Effekt haben könnte, was in Apoptose-, Proliferations- und Migrationsstudien weiter untersucht werden müsste. Dass eine Erhöhung der Acetylierung von p53 und Ku70 zu einer vermehrten Schädigung von Zellen und damit zu einer erhöhten Apoptoserate führt, ist aus vielen Studien bekannt.^{99,100,176,177}

Um einen verminderten Schutz der DNA nach Stimulation mit E2 in humanen Makrophagen nachzuweisen, könnte immunhistochemische Färbung von 8-Oxo-Guanin vorgenommen werden. Durch freie Hydroxylradikale von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können alle DNA-Basen oxidiert werden. Guanin ist wegen seines niedrigen Redoxpotentials besonders anfällig für Modifikationen.¹⁷⁸

Studien von Lee et al. konnten eine Absenkung der Sirt1-Proteinmenge nach Behandlung mit E2 in Gefäßmuskelzellen der Ratte nachweisen sowie einen Effekt von E2 auf die Apoptose, Proliferation und Migration.⁹⁵ Der Sirt1-Aktivator Resveratrol war in der Lage, alle diese Effekte rückgängig zu machen, was deutlich macht, dass eine Behandlung mit E2 die Vorgänge in der Zelle durch eine Regulation von Sirt1 steuert.⁹⁵

Um zu beweisen, dass die beobachteten Reaktionen Sirt1-abhängig sind, wäre ein Knockdown mit Small interfering RNA (siRNA) oder Small-hairpin-RNA (shRNA) nötig.^{179,180} Sollte sich keine oder nur eine teilweise Aufhebung der Effekte zeigen, wären weitere Versuche nötig, denn auch andere Deacetylasen können im Prozess der Acetylierung und Deacetylierung der Sirt1-Zielproteine eine Rolle spielen. Der Einfluss dieser Proteine müsste genauer untersucht werden. Beispielsweise konnten Studien von Gong et al. zeigen, dass eine Inhibition von Histondeacetylasen zu einer vermehrten Acetylierung von Ku70 führt und über einen Bax-vermittelten Signalweg eine wichtige Rolle bei der Induzierung des programmierten Zelltodes spielt.⁹⁹ Auch die Acetylierung von p53 wird außer durch Sirt1 auch durch andere Histondeacetylasen und Histonacetyltransferase beeinflusst.^{67,71,139,181,182} Um die in dieser Arbeit erforschten Prozesse der Interaktion von E2 und Sirt1 in humanen Makrophagen besser zu verstehen, sind weitere Versuche zu den anderen Deacetylasen vonnöten.

Ob die Erhöhung der NFκB-p65-Reaktion in männlichen Makrophagen ein direkter Effekt von E2 ist oder ob Sirt1 hier eine Rolle spielt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Um die E2-vermittelten Auswirkungen der Sirt1-Menge auf die Aktivität von NFκB zu ergründen, wäre eine Messung der Sirt1-vermittelten Acetylierung von NFκB-p65 nötig. Auch hier wäre im Folgenden ein Knockdown mit Small interfering RNA (siRNA) oder Small-hairpin-RNA (shRNA) durchzuführen. Um den entzündlichen Zustand der männlichen Makrophagen nachzuweisen, wäre weiterhin die Messung der NFκB vermittelten Entzündungsmediatoren (bspw. COX-2, IL-6 oder MCP-1) anzuraten. Auch eine Messung des NFκB-Inhibitors IκBa zur Bestimmung des Sirt1-Einflusses wäre denkbar. Eine Erhöhung der Sirt1-Aktivität im Tiermodell führt zu einer Senkung der Proteinmenge

der p65-Untereinheit des NFκB-Komplexes, da Sirt1 NFκB-p65 deacetyliert und somit für dessen Abbau sorgt.¹⁰¹

Eine Differenzierung anhand des Alters und der Zyklusphase ist in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt. Der Vergleich einer prämenopausalen Gruppe (18-45 Jahre) mit einer postmenopausalen Gruppe (65-75 Jahre) wäre ein guter Ansatzpunkt für weitere Studien. Auch eine differenzierte Betrachtung der Zyklusphase der prämenopausalen Frauen und die Bestimmung des Östrogen-Levels in der prämenopausalen Gruppe wären möglich.

Eine Übertragung der Erkenntnisse auf die klinische Forschung wäre durch *in vivo* und *in vitro*-Studien an kranken Individuen möglich. Interessant wäre es beispielsweise, die Effekte von E2 auf die Entzündungsprozesse im Rahmen der Atherogenese zu untersuchen. Im Blutkreislauf zirkulierende Makrophagen sind nur eine der vielen Zellarten, die einen Einfluss auf die Atherogenese haben. Studien von Gorenne et al. an humanen atherosklerotischen Plaques und normalen Gefäßen konnten zeigen, dass die Menge des Proteins Sirt1 in humanen atherosklerotischen Plaques und in seneszenten glatten Gefäßmuskeln reduziert ist.^{183,184} Studien von Chan et al. konnten in primären humanen Monozyten von alten Patienten mit KHK eine Sirt1-Erniedrigung beobachten, wobei keine differenzierte Betrachtung nach dem Geschlecht erfolgte, die p53-Acetylierung war erhöht.¹⁸⁵

Um einen isolierten Einfluss von E2 auf die Immunkomponente in der Atherogenese zu untersuchen, müssten Patienten untersucht werden, die eine Verkalkung der Gefäße aufweisen, ohne gleichzeitig unter Einfluss der klassischen Faktoren des metabolischen Syndroms zu stehen, wie beispielsweise Adipositas, Bluthochdruck und Diabetes mellitus. Zudem müssten erbliche Komponenten ausgeschlossen werden.

4.8 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit und die Studien, die aus dieser Arbeit noch folgen werden, könnten das Verständnis der Interaktion zwischen der Aktivierung des Östrogenrezeptors und der NAD⁺-abhängigen Deacetylase Sirt1 verbessern. Denkbar wäre zukünftig die Entwicklung eines pharmakologischen Targets, das die Sirt1-Aktivität beeinflusst und somit vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen schützt.

Das Absenken des Sirt1-Levels unter Behandlung mit E2 und die damit verbundenen Einbußen in der Funktionalität von humanen Makrophagen weisen auf eine potentiell schädliche Wirkung des E2

auf die Gefäßgesundheit hin. Ein Unterschied in der Behandlung mit E2 zwischen Männern und Frauen konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse können den negativen Einfluss einer Östrogen-Ersatz-Therapie auf kardiovaskuläre Erkrankungen teilweise erklären, wie er in zahlreichen anderen klinischen Studien nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Teil die in vielen Tierversuchen und einigen humanen Studien erhobenen Effekte von E2 auf die Sirt1-Proteinmenge.^{88,95,129}

Mit den durchgeführten Experimenten in humanen Makrophagen konnte der Einfluss von E2 auf die Menge des Proteins Sirt1 und des Gehaltes der Sirt1-Zielproteine genauer beschrieben werden. Das Verständnis der Interaktion von E2 und Sirt1 in humanen Makrophagen ist ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis der Effekte von E2 und Östrogen-Ersatz-Therapie auf die Entstehung von Atherosklerose und die Gefäßgesundheit. Dies könnte zu einer Optimierung der Hormonersatztherapie postmenopausaler Frauen einen wichtigen Beitrag leisten.

5 Literaturverzeichnis

1. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Annals of Translational Medicine*. 2016;4:256. doi: 10.21037/atm.2016.06.33
2. Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Gavazzi A, Hobbs R, Korewicki J, et al. 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. *European heart journal*. 2003;24:442-463.
3. Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2006;332:73-78. doi: 10.1136/bmj.38678.389583.7C
4. Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK. Sex hormones and hypertension. *Cardiovascular research*. 2002;53:688-708.
5. Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW, Wing RR. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *The New England journal of medicine*. 1989;321:641-646. doi: 10.1056/nejm198909073211004
6. Ounpuu S, Negassa A, Yusuf S. INTER-HEART: A global study of risk factors for acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2001;141:711-721. doi: 10.1067/mhj.2001.114974
7. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5:425-438. doi: 10.1038/nrd2032
8. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357-1361.
9. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *New England Journal of Medicine*. 2008;359:2195-2207. doi: 10.1056/NEJMoa0807646
10. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241. doi: 10.1038/35025203
11. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340:115-126. doi: 10.1056/nejm199901143400207
12. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2005;352:1685-1695. doi: 10.1056/NEJMra043430

13. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science (New York, NY)*. 1973;180:1332-1339.
14. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20:1262-1275.
15. Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. 2009;30:1482-1491. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.040
16. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005;5:953-964. doi: 10.1038/nri1733
17. Kapellos TS, Iqbal AJ. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016:6591703. doi: 10.1155/2016/6591703
18. Ryomoto M, Wolff RA, Tomas JJ, Miyamoto T, Hoch JR. 17 beta-estradiol attenuates intimal hyperplasia and macrophage accumulation with a reduction in monocyte chemoattractant protein 1 expression in a vein graft model. *Journal of vascular surgery*. 2002;36:613-621.
19. Arnal JF, Douin-Echinard V, Brouchet L, Tremollieres F, Laurell H, Lenfant F, Gadeau AP, Guery JC, Gourdy P. Understanding the oestrogen action in experimental and clinical atherosclerosis. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2006;20:539-548. doi: 10.1111/j.1472-8206.2006.00445.x
20. Seli E, Pehlivan T, Selam B, Garcia-Velasco JA, Arici A. Estradiol down-regulates MCP-1 expression in human coronary artery endothelial cells. *Fertility and sterility*. 2002;77:542-547.
21. Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *The Lancet*. 349:1146-1147. doi: 10.1016/S0140-6736(05)63022-X
22. Mikkola TS, Clarkson TB. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovascular research*. 2002;53:605-619. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00466-7
23. Clarkson TB, Anthony MS, Klein KP. Hormone replacement therapy and coronary artery atherosclerosis: the monkey model. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996;103 Suppl 13:53-57; discussion 57-58.
24. Clarkson TB. Estrogen effects on arteries vary with stage of reproductive life and extent of subclinical atherosclerosis progression. *Menopause (New York, NY)*. 2007;14:373-384. doi: 10.1097/GME.0b013e31803c764d

25. Hodis HN, Mack WJ, Henderson VW, Shoupe D, Budoff MJ, Hwang-Levine J, Li Y, Feng M, Dustin L, Kono N, et al. Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol. *The New England journal of medicine*. 2016;374:1221-1231. doi: 10.1056/NEJMoa1505241
26. Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, Selzer RH, Liu Cr CR, Liu Ch CH, Azen SP. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine*. 2001;135:939-953.
27. Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annual review of immunology*. 1995;13:307-338. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.001515
28. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Seriola B, Secchi ME, Villaggio B, Straub RH. Estrogens and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1089:538-547. doi: 10.1196/annals.1386.043
29. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine reviews*. 2007;28:521-574. doi: 10.1210/er.2007-0001
30. Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine reviews*. 2002;23:90-119. doi: 10.1210/edrv.23.1.0456
31. Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock (Augusta, Ga)*. 2001;16:340-343.
32. Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA. Estradiol suppresses NF-kappa B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184:5029-5037. doi: 10.4049/jimmunol.0903463
33. Wang M, Tsai BM, Reiger KM, Brown JW, Meldrum DR. 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:205-212. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.06.019
34. Capellino S, Straub RH, Cutolo M. Aromatase and regulation of the estrogen-to-androgen ratio in synovial tissue inflammation: common pathway in both sexes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1317:24-31. doi: 10.1111/nyas.12398
35. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriola B, Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*. 2004;13:635-638. doi: 10.1191/0961203304lu1094oa
36. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *The New England journal of medicine*. 2002;346:340-352. doi: 10.1056/NEJMra000471

37. Rettberg JR, Yao J, Brinton RD. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2014;35:8-30. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.08.001
38. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007;265-266:138-142. doi: 10.1016/j.mce.2006.12.010
39. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001;276:36869-36872. doi: 10.1074/jbc.R100029200
40. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2004;18:1859-1875. doi: 10.1210/me.2003-0044
41. Duarte FH, Jallad RS, Bronstein MD. Estrogens and selective estrogen receptor modulators in acromegaly. *Endocrine*. 2016;54:306-314. doi: 10.1007/s12020-016-1118-z
42. Szego CM, Davis JS. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1967;58:1711-1718. doi: 10.1073/pnas.58.4.1711
43. Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auburger P, Pouysségur J. Defective Thymocyte Maturation in p44 MAP Kinase (Erk 1) Knockout Mice. *Science (New York, NY)*. 1999;286:1374-1377. doi: 10.1126/science.286.5443.1374
44. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138:863-870. doi: 10.1210/endo.138.3.4979
45. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5925-5930.
46. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology*. 2015;294:63-69. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.01.018
47. Campbell L, Emmerson E, Williams H, Saville CR, Krust A, Chambon P, Mace KA, Hardman MJ. Estrogen receptor-alpha promotes alternative macrophage activation during cutaneous repair. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134:2447-2457. doi: 10.1038/jid.2014.175
48. Cencioni C, Spallotta F, Mai A, Martelli F, Farsetti A, Zeiher AM, Gaetano C. Sirtuin function in aging heart and vessels. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;83:55-61. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.12.023
49. Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med*. 2007;39:335-345. doi: 10.1080/07853890701408194
50. Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2007;21:1745-1755. doi: 10.1210/me.2007-0079

51. Bai W, Zhang X. Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's subcellular localization. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2016;15:3337-3338. doi: 10.1080/15384101.2016.1237170
52. Byles V, Chmielewski LK, Wang J, Zhu L, Forman LW, Faller DV, Dai Y. Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int J Biol Sci*. 2010;6:599-612. doi: 10.7150/ijbs.6.599
53. Jin Q, Yan T, Ge X, Sun C, Shi X, Zhai Q. Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis. *Journal of cellular physiology*. 2007;213:88-97. doi: 10.1002/jcp.21091
54. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem*. 2007;282:6823-6832. doi: 10.1074/jbc.M609554200
55. Cardellini M, Menghini R, Martelli E, Casagrande V, Marino A, Rizza S, Porzio O, Mauriello A, Solini A, Ippoliti A, et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. *Diabetes*. 2009;58:2396-2401. doi: 10.2337/db09-0280
56. Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, Sunagawa K. SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28:1263-1269. doi: 10.1161/atvbaha.108.166991
57. Mattagajasingh I, Kim C-S, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung S-B, DeRicco J, Kasuno K, Irani K. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14855-14860. doi: 10.1073/pnas.0704329104
58. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*. 2004;23:2369-2380. doi: 10.1038/sj.emboj.7600244
59. Gano LB, Donato AJ, Pasha HM, Hearon CM, Jr., Sindler AL, Seals DR. The SIRT1 activator SRT1720 reverses vascular endothelial dysfunction, excessive superoxide production, and inflammation with aging in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;307:H1754-1763. doi: 10.1152/ajpheart.00377.2014
60. Moore RL, Faller DV. SIRT1 Represses Estrogen-signaling, Ligand-Independent ER α -mediated Transcription, and Cell Proliferation in Estrogen-Responsive Breast Cells. *The Journal of endocrinology*. 2013;216:10.1530/JOE-1512-0102. doi: 10.1530/JOE-12-0102
61. Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent Regulation of Chromatin and Transcription: Linking NAD(+) Metabolism and Signaling to the Control of Cellular Functions. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804:1666-1675. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.10.022

62. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995;80:293-299.
63. Jeong J, Juhn K, Lee H, Kim S-H, Min B, Lee K-M, Cho M-H, Park G, Lee K-H. *SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70*. 2007.
64. Yamamoto Y, Gaynor RB. IκB kinases: key regulators of the NF-κB pathway. *Trends Biochem Sci*. 2004;29:72-79. doi: 10.1016/j.tibs.2003.12.003
65. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-κB and IκB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci*. 2005;30:43-52. doi: 10.1016/j.tibs.2004.11.009
66. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*. 2011;3:994-1013. doi: 10.3390/cancers3010994
67. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 1997;90:595-606. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80521-8
68. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 2007;100. doi: 10.1161/01.RES.0000267723.65696.4a
69. Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2259-2264.
70. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2α promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107:137-148.
71. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001;107:149-159.
72. Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle*. 2009;8:712-715. doi: 10.4161/cc.8.5.7753
73. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447:1130-1134. doi: 10.1038/nature05939
74. Manila H, Ps Kwok R. *Regulation of Ku70-Bax Complex in Cells*. 2014.
75. Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA, Matsuyama S. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nature cell biology*. 2003;5:320-329. doi: 10.1038/ncb950
76. Fujita T, Nolan GP, Ghosh S, Baltimore D. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-κB. *Genes & development*. 1992;6:775-787. doi: 10.1101/gad.6.5.775

77. Scott ML, Fujita T, Liou HC, Nolan GP, Baltimore D. The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes & development*. 1993;7:1266-1276. doi: 10.1101/gad.7.7a.1266
78. Liu T, Liu PY, Marshall GM. The Critical Role of the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer. *Cancer Research*. 2009;69:1702-1705. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-3365
79. Yang XD, Tajkhorshid E, Chen LF. Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB. *Molecular and cellular biology*. 2010;30:2170-2180. doi: 10.1128/mcb.01343-09
80. Bernier M, Paul RK, Martin-Montalvo A, Scheibye-Knudsen M, Song S, He HJ, Armour SM, Hubbard BP, Bohr VA, Wang L, et al. Negative regulation of STAT3 protein-mediated cellular respiration by SIRT1 protein. *J Biol Chem*. 2011;286:19270-19279. doi: 10.1074/jbc.M110.200311
81. Lim JW, Kim H, Kim KH. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2001;81:349-360.
82. Donadelli R, Abbate M, Zanchi C, Corna D, Tomasoni S, Benigni A, Remuzzi G, Zoja C. Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2000;36:1226-1241. doi: 10.1053/ajkd.2000.19838
83. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney international*. 1995;48:1263-1271.
84. Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Molecular cell*. 2006;23:607-618. doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.026
85. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, NY)*. 2009;325:834-840. doi: 10.1126/science.1175371
86. Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure JL, Sonoda N, Bae EJ, Oh DY, Lu M, Milne JC, Westphal C, et al. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2010;298:E419-E428. doi: 10.1152/ajpendo.00417.2009
87. Shen T, Ding L, Ruan Y, Qin W, Lin Y, Xi C, Lu Y, Dou L, Zhu Y, Cao Y, et al. SIRT1 functions as an important regulator of estrogen-mediated cardiomyocyte protection in angiotensin II-induced heart hypertrophy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:713894. doi: 10.1155/2014/713894

88. Toniolo A, Warden EA, Nassi A, Cignarella A, Bolego C. Regulation of SIRT1 in vascular smooth muscle cells from streptozotocin-diabetic rats. *PLoS one*. 2013;8:e65666. doi: 10.1371/journal.pone.0065666
89. Kim MY, Woo EM, Chong YT, Homenko DR, Kraus WL. Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2006;20:1479-1493. doi: 10.1210/me.2005-0531
90. Moore RL, Faller DV. SIRT1 represses estrogen-signaling, ligand-independent ERalpha-mediated transcription, and cell proliferation in estrogen-responsive breast cells. *J Endocrinol*. 2013;216:273-285. doi: 10.1530/joe-12-0102
91. Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, Ananth S, Gnana-Prakasam JP, Martin PM, Browning DD, Schoenlein PV, Prasad PD, Ganapathy V, et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer. *Cancer research*. 2011;71:6654-6664. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1446
92. Yao Y, Li H, Gu Y, Davidson NE, Zhou Q. Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling. *Carcinogenesis*. 2010;31:382-387. doi: 10.1093/carcin/bgp308
93. Yao Y, Brodie AM, Davidson NE, Kensler TW, Zhou Q. Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124:585-591. doi: 10.1007/s10549-010-1023-8
94. Elbaz A, Rivas D, Duque G. Effect of estrogens on bone marrow adipogenesis and Sirt1 in aging C57BL/6J mice. *Biogerontology*. 2009;10:747-755. doi: 10.1007/s10522-009-9221-7
95. Lee C-H, Su S-C, Chiang C-F, Chien C-Y, Hsu C-C, Yu T-Y, Huang S-M, Shieh Y-S, Kao H-W, Tsai C-S, et al. Estrogen modulates vascular smooth muscle cell function through downregulation of SIRT1. *Oncotarget*. 2017;8:110039-110051. doi: 10.18632/oncotarget.22546
96. Liarte S, Alonso-Romero JL, Nicolás FJ. SIRT1 and Estrogen Signaling Cooperation for Breast Cancer Onset and Progression. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:552-552. doi: 10.3389/fendo.2018.00552
97. Jeong J, Juhn K, Lee H, Kim SH, Min BH, Lee KM, Cho MH, Park GH, Lee KH. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Experimental & molecular medicine*. 2007;39:8-13. doi: 10.1038/emm.2007.2
98. Lee JT, Gu W. SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation. *Genes & cancer*. 2013;4:112-117. doi: 10.1177/1947601913484496
99. Gong P, Wang Y, Jing Y. Apoptosis Induction by Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Cells: Role of Ku70. *Int J Mol Sci*. 2019;20. doi: 10.3390/ijms20071601

100. Mrakovcic M, Kleinheinz J, Frohlich LF. p53 at the Crossroads between Different Types of HDAC Inhibitor-Mediated Cancer Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2019;20. doi: 10.3390/ijms20102415
101. Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, Leung S, Zhong Z, Zhao H, Sweitzer S, et al. SIRT1 Activators Suppress Inflammatory Responses through Promotion of p65 Deacetylation and Inhibition of NF- κ B Activity. *PLoS one.* 2012;7:e46364. doi: 10.1371/journal.pone.0046364
102. Yang M, Yan J, Wu A, Zhao W, Qin J, Pogwizd SM, Wu X, Yuan S, Ai X. Alterations of housekeeping proteins in human aged and diseased hearts. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2021;473:351-362. doi: 10.1007/s00424-021-02538-x
103. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology.* 1999;75:291-295. doi: 10.1016/s0168-1656(99)00163-7
104. Moritz CP. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *Proteomics.* 2017;17. doi: 10.1002/pmic.201600189
105. Hu X, Du S, Yu J, Yang X, Yang C, Zhou D, Wang Q, Qin S, Yan X, He L, et al. Common housekeeping proteins are upregulated in colorectal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma, making the total protein a better "housekeeper". *Oncotarget.* 2016;7:66679-66688. doi: 10.18632/oncotarget.11439
106. Thacker JS, Yeung DH, Staines WR, Mielke JG. Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem.* 2016;496:76-78. doi: 10.1016/j.ab.2015.11.022
107. Litovchick L. Staining the Blot for Total Protein with Ponceau S. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020;2020:098459. doi: 10.1101/pdb.prot098459
108. Lin R, Tao R, Gao X, Li T, Zhou X, Guan K-L, Xiong Y, Lei Q-Y. Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth. *Molecular cell.* 2013;51:506-518. doi: 10.1016/j.molcel.2013.07.002
109. Nadtochiy SM, Yao H, McBurney MW, Gu W, Guarente L, Rahman I, Brookes PS. SIRT1-mediated acute cardioprotection. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2011;301:H1506-1512. doi: 10.1152/ajpheart.00587.2011
110. Yang Y, Wolfe A, Yang XF. Identification of Acetylated Proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2018;1690:177-182. doi: 10.1007/978-1-4939-7383-5_14
111. Rosner M, Schipany K, Hengstschlager M. Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle. *Nature Protocols.* 2013;8:602. doi: 10.1038/nprot.2013.011

112. Luz JM, Lennarz WJ. Protein disulfide isomerase: a multifunctional protein of the endoplasmic reticulum. *Exs.* 1996;77:97-117. doi: 10.1007/978-3-0348-9088-5_7
113. Perrotta I, Aquila S, Mazzulla S. Expression profile and subcellular localization of GAPDH in the smooth muscle cells of human atherosclerotic plaque: an immunohistochemical and ultrastructural study with biological therapeutic perspectives. *Microsc Microanal.* 2014;20:1145-1157. doi: 10.1017/s1431927614001020
114. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports.* 2014;6:13. doi: 10.12703/P6-13
115. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2006;177:7303-7311.
116. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53:676-688. doi: 10.1165/rcmb.2015-0012OC
117. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32:593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007
118. Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PLoS one.* 2009;4:e5539-e5539. doi: 10.1371/journal.pone.0005539
119. Pelekanou V, Kampa M, Kiagiadaki F, Deli A, Theodoropoulos P, Agrogiannis G, Patsouris E, Tsapis A, Castanas E, Notas G. Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ERalpha36 and GPR30/GPER1. *Journal of leukocyte biology.* 2016;99:333-347. doi: 10.1189/jlb.3A0914-430RR
120. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology.* 2015;294:63-69. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.01.018
121. Reddy RC, Estill CT, Meaker M, Stormshak F, Roselli CE. Sex differences in expression of oestrogen receptor α but not androgen receptor mRNAs in the foetal lamb brain. *Journal of neuroendocrinology.* 2014;26:321-328. doi: 10.1111/jne.12152
122. Buckley J, Willingham E, Agras K, Baskin LS. Embryonic exposure to the fungicide vinclozolin causes virilization of females and alteration of progesterone receptor expression in vivo: an experimental study in mice. *Environmental Health.* 2006;5:4. doi: 10.1186/1476-069X-5-4

123. Bulayeva NN, Gametchu B, Watson CS. Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids*. 2004;69:181-192. doi: 10.1016/j.steroids.2003.12.003
124. Pinceti E, Shults CL, Rao YS, Pak TR. Differential Effects of E2 on MAPK Activity in the Brain and Heart of Aged Female Rats. *PLoS one*. 2016;11:e0160276-e0160276. doi: 10.1371/journal.pone.0160276
125. Chang J-H, Tsai S-Y, Zeng Y-J, Liu Y-C, Li C-Y, Chen K-B, Wen Y-R. Ovarian Hormone-dependent and Spinal ERK Activation-regulated Nociceptive Hypersensitivity in Female Rats with Acid Injection-induced Chronic Widespread Muscle Pain. *Scientific Reports*. 2019;9:3077. doi: 10.1038/s41598-019-39472-z
126. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2018;19:1801. doi: 10.3390/ijms19061801
127. Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F, Yao Y-M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*. 2014;10:520-529. doi: 10.7150/ijbs.8879
128. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2019;10. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084
129. Liu Y, Guo Y, Huang W, Deng KY, Qian Y, Xin HB. 17beta-Estradiol Promotes Apoptosis in Airway Smooth Muscle Cells Through CD38/SIRT1/p53 Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:770. doi: 10.3389/fendo.2018.00770
130. Khan M, Shah SA, Kim MO. 17beta-Estradiol via SIRT1/Acetyl-p53/NF-kB Signaling Pathway Rescued Postnatal Rat Brain Against Acute Ethanol Intoxication. *Molecular neurobiology*. 2018;55:3067-3078. doi: 10.1007/s12035-017-0520-8
131. Shen T, Ding L, Ruan Y, Qin W, Lin Y, Xi C, Lu Y, Dou L, Zhu Y, Cao Y, et al. SIRT1 functions as an important regulator of estrogen-mediated cardiomyocyte protection in angiotensin II-induced heart hypertrophy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:713894-713894. doi: 10.1155/2014/713894
132. Sasaki Y, Ikeda Y, Miyauchi T, Uchikado Y, Akasaki Y, Ohishi M. Estrogen-SIRT1 Axis Plays a Pivotal Role in Protecting Arteries Against Menopause-Induced Senescence and Atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2020;27:47-59. doi: 10.5551/jat.47993
133. Tseng JE, Rodriguez M, Ro J, Liu D, Hong WK, Mao L. Gender differences in p53 mutational status in small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1999;59:5666-5670.

134. Lee CW, Wong LL, Tse EY, Liu HF, Leong VY, Lee JM, Hardie DG, Ng IO, Ching YP. AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer Res.* 2012;72:4394-4404. doi: 10.1158/0008-5472.can-12-0429
135. Liu B, Lei M, Hu T, Yu F, Xiao DM, Kang H. Inhibitory effects of SRT1720 on the apoptosis of rabbit chondrocytes by activating SIRT1 via p53/bax and NF-kappaB/PGC-1alpha pathways. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban.* 2016;36:350-355. doi: 10.1007/s11596-016-1590-y
136. Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, Huber LJ. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Molecular and cellular biology.* 2006;26:28-38. doi: 10.1128/mcb.26.1.28-38.2006
137. Roth M, Wang Z, Chen WY. SIRT1 and LSD1 competitively regulate KU70 functions in DNA repair and mutation acquisition in cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7:50195-50214. doi: 10.18632/oncotarget.10328
138. Brandl A, Wagner T, Uhlig KM, Knauer SK, Stauber RH, Melchior F, Schneider G, Heinzl T, Kramer OH. Dynamically regulated sumoylation of HDAC2 controls p53 deacetylation and restricts apoptosis following genotoxic stress. *Journal of molecular cell biology.* 2012;4:284-293. doi: 10.1093/jmcb/mjs013
139. Mrakovcic M, Kleinheinz J, Fröhlich LF. p53 at the Crossroads between Different Types of HDAC Inhibitor-Mediated Cancer Cell Death. *International journal of molecular sciences.* 2019;20:2415. doi: 10.3390/ijms20102415
140. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular cell.* 2004;16:93-105. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.031
141. Close P, Creppe C, Gillard M, Ladang A, Chapelle JP, Nguyen L, Chariot A. The emerging role of lysine acetylation of non-nuclear proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:1255-1264. doi: 10.1007/s00018-009-0252-7
142. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 2005;363:15-23. doi: 10.1016/j.gene.2005.09.010
143. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor κ B. *Oncogene.* 2006;25:6868. doi: 10.1038/sj.onc.1209935
144. Matejuk A, Adlard K, Zamora A, Silverman M, Vandenbark AA, Offner H. 17 beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of

- female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*. 2001;65:529-542. doi: 10.1002/jnr.1183
145. Messingham KA, Heinrich SA, Kovacs EJ. Estrogen restores cellular immunity in injured male mice via suppression of interleukin-6 production. *Journal of leukocyte biology*. 2001;70:887-895.
 146. Pioli PA, Jensen AL, Weaver LK, Amiel E, Shen Z, Shen L, Wira CR, Guyre PM. Estradiol attenuates lipopolysaccharide-induced CXC chemokine ligand 8 production by human peripheral blood monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179:6284-6290.
 147. Xing D, Oparil S, Yu H, Gong K, Feng W, Black J, Chen Y-F, Nozell S. Estrogen modulates NF κ B signaling by enhancing I κ B α levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor- β . *PLoS one*. 2012;7:e36890-e36890. doi: 10.1371/journal.pone.0036890
 148. Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA. Estradiol suppresses NF-kappa B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184:5029-5037. doi: 10.4049/jimmunol.0903463
 149. Stice JP, Mbai FN, Chen L, Knowlton AA. Rapid activation of nuclear factor κ B by 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators: pathways mediating cellular protection. *Shock (Augusta, Ga)*. 2012;38:128-136. doi: 10.1097/SHK.0b013e31825da754
 150. Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PLoS one*. 2009;4:e5539. doi: 10.1371/journal.pone.0005539
 151. Gilliver SC. Sex steroids as inflammatory regulators. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120:105-115. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.12.015
 152. Diedrich M, Tadic J, Mao L, Wacker MA, Nebrich G, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V, Klose J. Heart protein expression related to age and sex in mice and humans. *International journal of molecular medicine*. 2007;20:865-874.
 153. Vural P, Akgul C, Canbaz M. Effects of hormone replacement therapy on plasma pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and some bone turnover markers in postmenopausal women. *Pharmacol Res*. 2006;54:298-302. doi: 10.1016/j.phrs.2006.06.006
 154. Schröder J, Kahlke V, Staubach K-H, Zabel P, Stüber F. Gender Differences in Human Sepsis. *Archives of Surgery*. 1998;133:1200-1205. doi: 10.1001/archsurg.133.11.1200
 155. Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM. TNF- α Gene Expression in Macrophages: Regulation by NF- κ B Is Independent of c-Jun or C/EBP β . *The Journal of Immunology*. 2000;164:4277-4285. doi: 10.4049/jimmunol.164.8.4277
 156. Schutze S, Wiegmann K, Machleidt T, Kronke M. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology*. 1995;193:193-203.

157. Wu Y, Zhou BP. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 2010;102:639. doi: 10.1038/sj.bjc.6605530
158. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004;118:285-296. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.013
159. Martín-Sánchez F, Diamond C, Zeitler M, Gomez AI, Baroja-Mazo A, Bagnall J, Spiller D, White M, Daniels MJD, Mortellaro A, et al. Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation. *Cell Death Differ*. 2016;23:1219-1231. doi: 10.1038/cdd.2015.176
160. Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Predominant expression of Sir2alpha, an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. *FEBS letters*. 2004;556:281-286. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01444-3
161. Yanagisawa S, Baker JR, Vuppusetty C, Koga T, Colley T, Fenwick P, Donnelly LE, Barnes PJ, Ito K. The dynamic shuttling of SIRT1 between cytoplasm and nuclei in bronchial epithelial cells by single and repeated cigarette smoke exposure. *PloS one*. 2018;13:e0193921-e0193921. doi: 10.1371/journal.pone.0193921
162. Cutolo M, Villaggio B, Bisso A, Sulli A, Coviello D, Dayer JM. Presence of estrogen receptors in human myeloid monocytic cells (THP-1 cell line). *European cytokine network*. 2001;12:368-372.
163. Shozu M, Zhao Y, Simpson ER. Estrogen Biosynthesis in THP1 Cells Is Regulated by Promoter Switching of the Aromatase (CYP19) Gene*. *Endocrinology*. 1997;138:5125-5135. doi: 10.1210/endo.138.12.5562
164. Subramanian C, Hada M, Opipari AW, Jr., Castle VP, Kwok RPS. CREB-binding protein regulates Ku70 acetylation in response to ionization radiation in neuroblastoma. *Mol Cancer Res*. 2013;11:173-181. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0065
165. Chaudhary N, Nakka KK, Chavali PL, Bhat J, Chatterjee S, Chattopadhyay S. SMAR1 coordinates HDAC6-induced deacetylation of Ku70 and dictates cell fate upon irradiation. *Cell Death & Disease*. 2014;5:e1447. doi: 10.1038/cddis.2014.397
166. Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R, Miyagawa K, Hagiwara K, Ishikawa F, Takaku F, Yazaki Y, Hirai H. Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. *Blood*. 1992;79:2378-2383.
167. Welsh AW, Lannin DR, Young GS, Sherman ME, Figueroa JD, Henry NL, Ryden L, Kim C, Love RR, Schiff R, et al. Cytoplasmic estrogen receptor in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18:118-126. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-11-1236

168. Ford CH, Al-Bader M, Al-Ayadhi B, Francis I. Reassessment of estrogen receptor expression in human breast cancer cell lines. *Anticancer research*. 2011;31:521-527.
169. Zhang X, Carlisle SM, Doll MA, Martin RCG, States JC, Klinge CM, Hein DW. High N-Acetyltransferase 1 Expression Is Associated with Estrogen Receptor Expression in Breast Tumors, but Is not Under Direct Regulation by Estradiol, 5alpha-androstane-3beta,17beta-Diol, or Dihydrotestosterone in Breast Cancer Cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2018;365:84-93. doi: 10.1124/jpet.117.247031
170. Daskalaki MG, Tsatsanis C, Kampranis SC. Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *Journal of cellular physiology*. 2018;233:6495-6507. doi: 10.1002/jcp.26497
171. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003;370:737-749. doi: 10.1042/bj20021321
172. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:225-238. doi: 10.1038/nrm3293
173. Kovacs JJ, Hubbert C, Yao TP. The HDAC complex and cytoskeleton. *Novartis Found Symp*. 2004;259:170-177; discussion 178-181, 223-175.
174. Williams R, Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia, PA: Saunders. 2002.
175. Hirano S, Furutama D, Hanafusa T. Physiologically high concentrations of 17beta-estradiol enhance NF-kappaB activity in human T cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R1465-1471. doi: 10.1152/ajpregu.00778.2006
176. Al Emam A, Arbon D, Jeeves M, Kysela B. Ku70 N-terminal lysines acetylation/deacetylation is required for radiation-induced DNA-double strand breaks repair. *Neoplasma*. 2018;65:708-719. doi: 10.4149/neo_2018_171020N673
177. Koike M, Yutoku Y, Koike A. Cloning, localization and focus formation at DNA damage sites of canine Ku70. *The Journal of veterinary medical science*. 2017;79:554-561. doi: 10.1292/jvms.16-0649
178. Crespo-Hernandez CE, Close DM, Gorb L, Leszczynski J. Determination of redox potentials for the Watson-Crick base pairs, DNA nucleosides, and relevant nucleoside analogues. *The journal of physical chemistry B*. 2007;111:5386-5395. doi: 10.1021/jp0684224
179. Nguyen PA, Won JS, Rahman MK, Bae EJ, Cho MK. Modulation of Sirt1/NF-kB interaction of evogliptin is attributed to inhibition of vascular inflammatory response leading to attenuation of atherosclerotic plaque formation. *Biochemical pharmacology*. 2019;168:452-464. doi: 10.1016/j.bcp.2019.08.008

180. Yuan F, Wang J, Li R, Zhao X, Zhang Y, Liu B, Lei Y, Hu Y. A New Regulatory Mechanism Between P53 And YAP Crosstalk By SIRT1 Mediated Deacetylation To Regulate Cell Cycle And Apoptosis In A549 Cell Lines. *Cancer management and research*. 2019;11:8619-8633. doi: 10.2147/cmar.S214826
181. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Molecular cell*. 2006;24:841-851. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.026
182. Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Molecular cell*. 2006;24:827-839. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.021
183. Gorenne I, Kumar S, Gray K, Figg N, Yu H, Mercer J, Bennett M. Vascular smooth muscle cell sirtuin 1 protects against DNA damage and inhibits atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127:386-396. doi: 10.1161/circulationaha.112.124404
184. Mahmoudi M, Gorenne I, Mercer J, Figg N, Littlewood T, Bennett M. Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 2008;103:717-725. doi: 10.1161/circresaha.108.182899
185. Chan SH, Hung CH, Shih JY, Chu PM, Cheng YH, Lin HC, Tsai KL. SIRT1 inhibition causes oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Redox biology*. 2017;13:301-309. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.027

6 Anhang

6.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anne Breiter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Effekte von Östrogen auf den Proteingehalt, die Lokalisation und Funktion von Sirt1 in humanen Makrophagen / The effects of estrogen on protein amount, localization and function of Sirt1 in human macrophages selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

6.2 Lebenslauf

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

6.3 Publikationen

Poster:

Die Effekte von Östrogen auf die Expression, Lokalisation und Funktion von Sirt1 in Makrophagen

Anne Breiter, Maria Luisa Barcena de Arellano, Vera Regitz-Zagrosek

DGK-Kongress 2019

6.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank richtet sich an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek für die Vergabe des interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in den Forschungslaboren des Instituts für Geschlechterforschung in der Medizin der Charité Berlin anfertigen zu dürfen. Des Weiteren möchte ich mich für die hervorragende fachliche Beratung bei der Arbeit, die vielen helfenden Anregungen und vor allem für die herzliche Aufnahme in ihr Team bedanken.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. Maria-Luisa Barcena de Arellano für ihre kompetente Betreuung. Ohne ihre Unterstützung und die zahlreichen Anregungen wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch an Herrn Dr. Yury Ladilov für die vielen lehrreichen Diskussionen und die wertvollen Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Natalia Haritonow und Jenny Jansen für die qualifizierte und geduldige Einarbeitung und die Hilfe bei der täglichen Laborarbeit, sowie bei allen Mitarbeitern der AG Regitz-Zagrosek für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen guten Ratschläge.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Vignesh, Daniel P. und allen anderen Kollegen für ihre Tipps und ihre wissenschaftlichen Ratschläge sowie für ihre unterstützenden Worte.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern und meinen Großeltern dafür danken, dass sie mir mein Studium und die Durchführung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben sowie für ihren Beistand und ihre liebevolle Unterstützung in allen Phasen meines Lebens. Besonders danken möchte ich meinem Mann Pavelas für seine Liebe, sein Vertrauen und sein Verständnis.

Vielen Dank an die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie für die Förderung meiner Doktorarbeit durch das Otto-Hess-Promotionsstipendium.

6.5 Ponceau-Daten und Original Membranen

Effekte der ER-Aktivierung auf die Sirt1-Proteinmenge in M1-differenzierten primären humanen Makrophagen

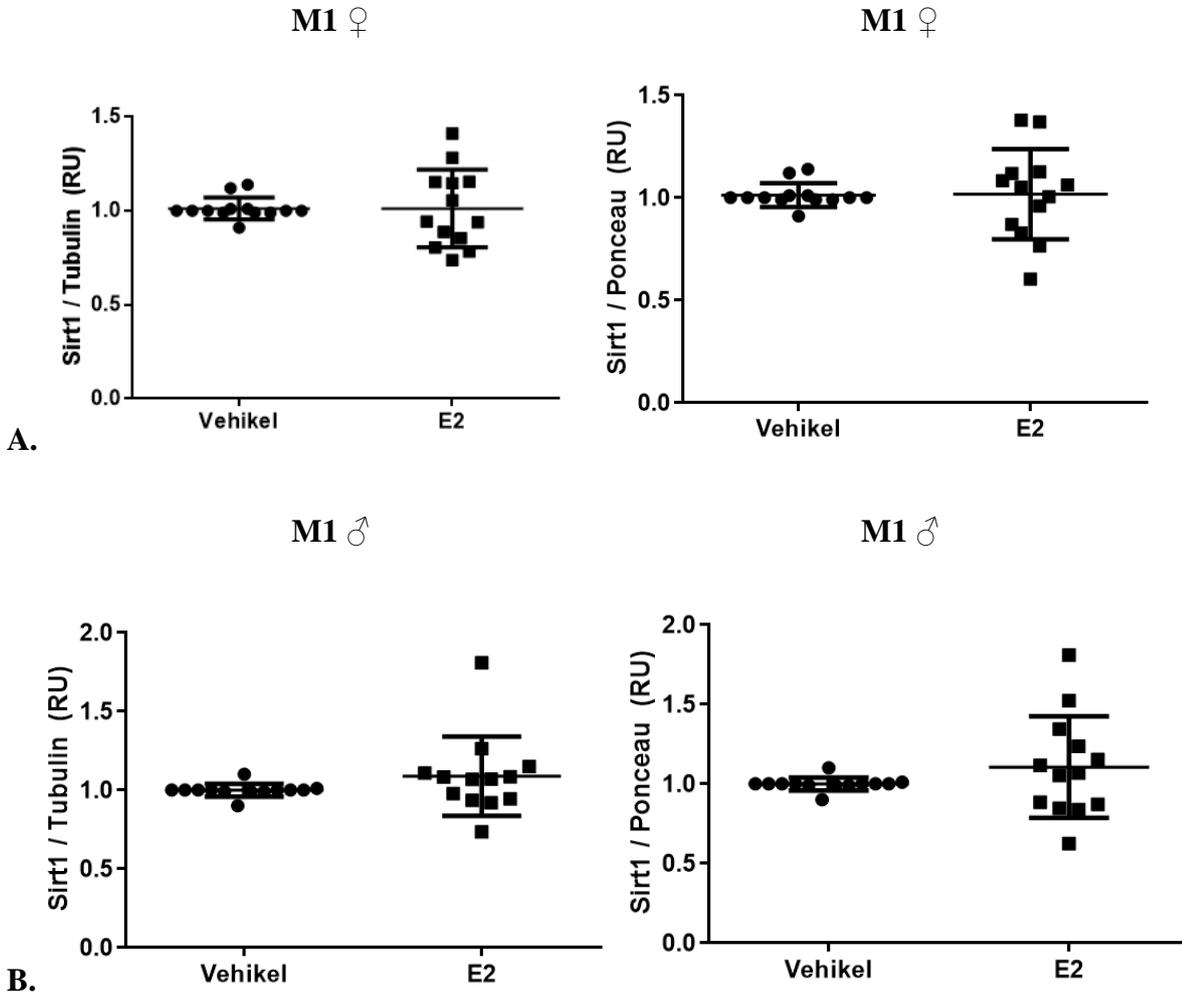


Abbildung 21. Sirt1-Proteinmenge in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen. Vergleich der Normalisierung auf verschiedene Housekeeping-Proteine: Tubulin und Normalisierung auf Ponceau S. E2 = 17-β-Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle

A. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf Tubulin und Ponceau S. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=13, p > 0,05).

B. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf Tubulin und Ponceau S. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=13, p > 0,05).

Globale Proteinacetylierung mittels Acetylierung der Lysinreste

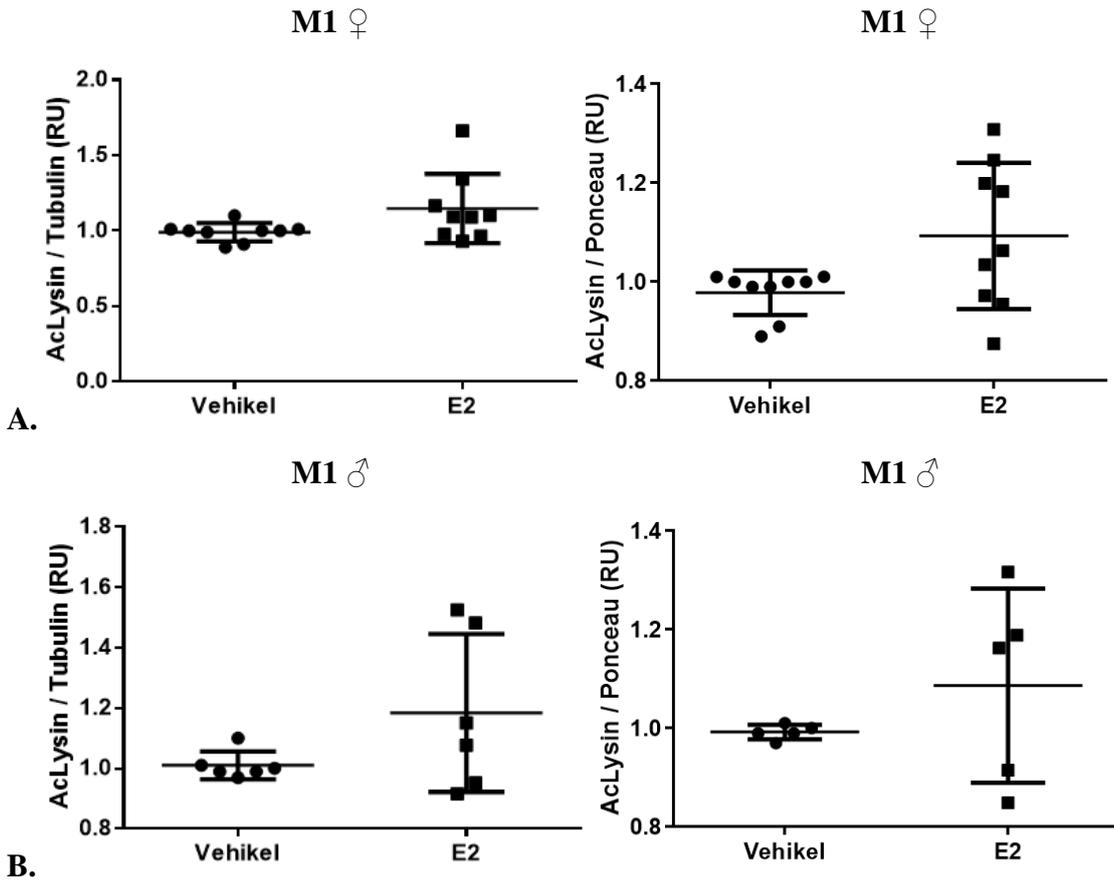


Abbildung 22. Proteinmenge von AcLysin in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen. Vergleich der Normalisierung auf verschiedene Housekeeping-Proteine: Tubulin und Normalisierung auf Ponceau S. E2 = 17- β -Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle

A. Statistische Analyse der Proteinmenge von AcLysin in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf Tubulin und Ponceau S. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=9, $p > 0,05$ bei Tubulin und bei Ponceau S).

B. Statistische Analyse der Proteinmenge von AcLysin in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf Tubulin und Ponceau S. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6 bei Tubulin, n=5 bei Ponceau S, $p > 0,05$).

Einfluss der Behandlung mit E2 auf die Proteinmenge der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB

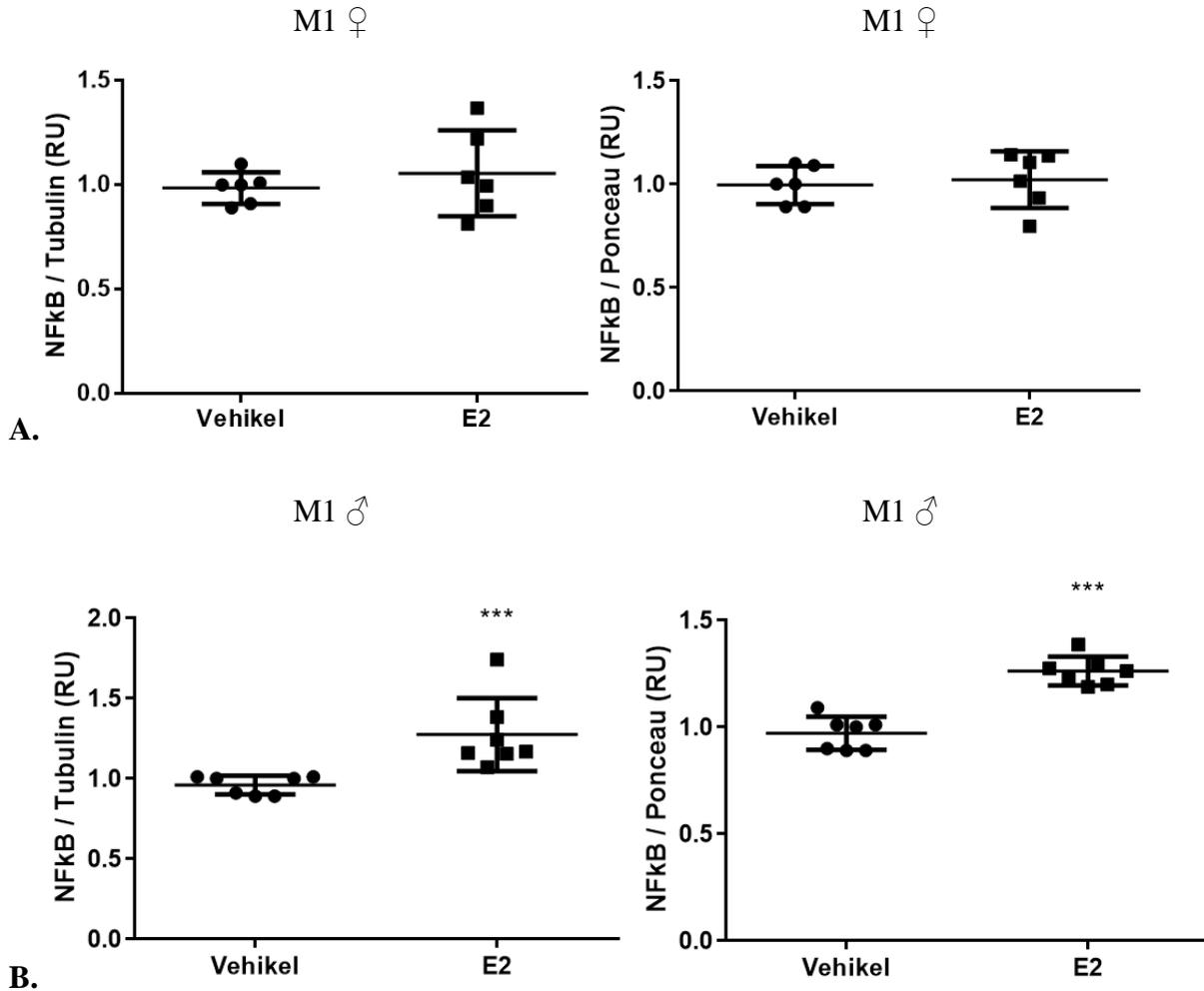


Abbildung 23. Proteinmenge von NFκB-p65 in humanen primären weiblichen und männlichen M1-Makrophagen. Vergleich der Normalisierung auf verschiedene Housekeeping-Proteine: Tubulin und Normalisierung auf Ponceau S. E2 = 17-β-Estradiol, Vehikel = Dextrin-Kontrolle

A. Statistische Analyse der Proteinmenge von NFκB-p65 in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus weiblichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf Tubulin und Ponceau S. Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung (n=6, $p > 0,05$ bei Tubulin und bei Ponceau S).

B. Statistische Analyse der Proteinmenge von NFκB-p65 in M1-polarisierten primären humanen Makrophagen aus männlichen Individuen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf Tubulin und Ponceau S. Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung (n=7, $***p < 0,001$ bei Tubulin und bei Ponceau S).

Effekte der ER-Aktivierung auf die Sirt1-Proteinmenge im Vollzellysat, der nukleären und nukleusfreien Fraktion von THP1-Makrophagen

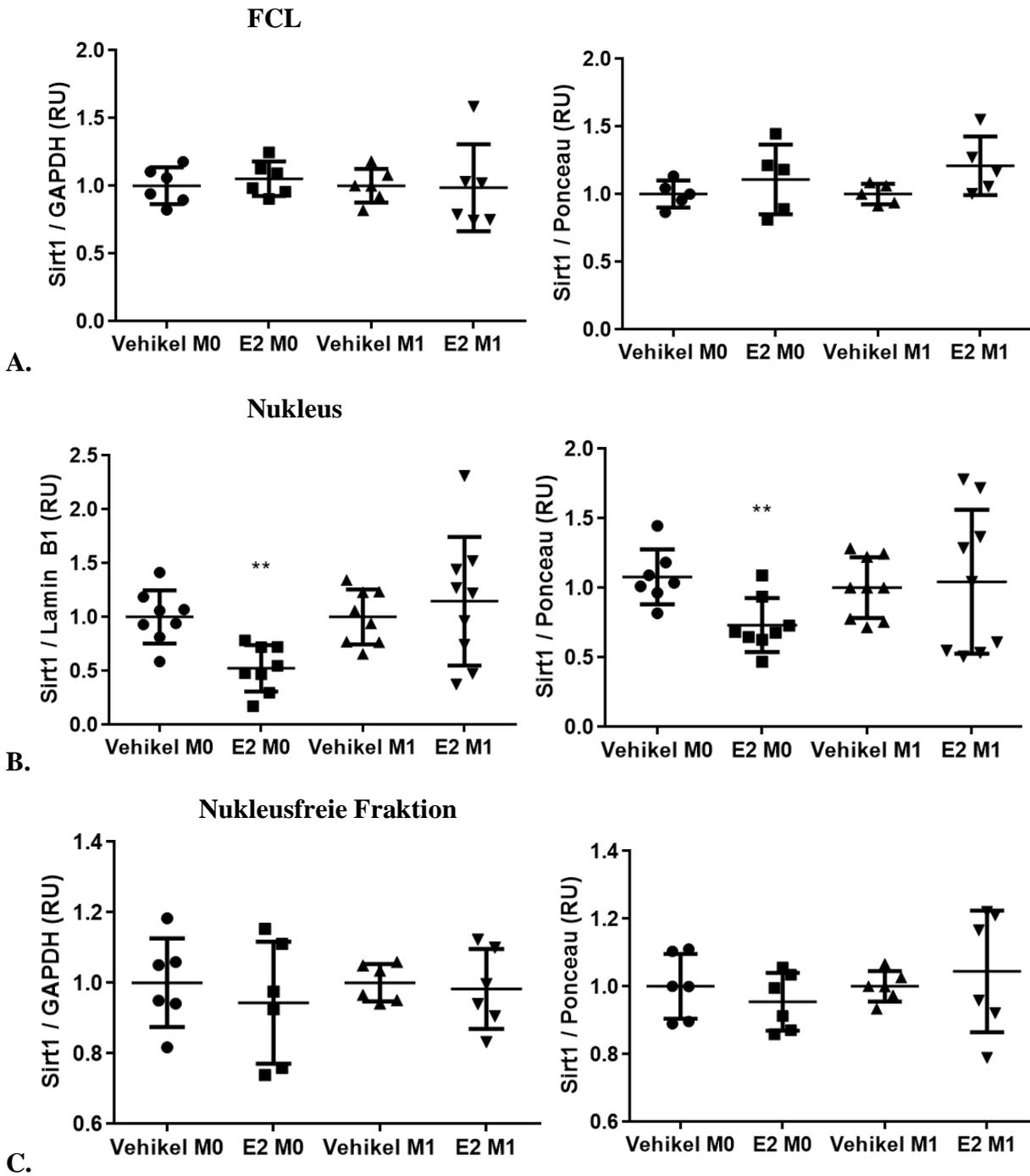


Abbildung 24. Sirt1-Proteinmenge in THP1-Makrophagen.

A. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge im Vollzellysat von THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf GAPDH und Ponceau. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung ($p > 0,05$ und $n=6$ für GAPDH; $p > 0,05$ und $n=5$ für Ponceau, da ein Individuum nicht auswertbar im Ponceau-Bild).

B. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge in der Nukleusfraktion der THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf Lamin B1 und Ponceau. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=8, $**p < 0,001$).

C. Statistische Analyse der relativen Sirt1-Proteinmenge in der nukleusfreien Fraktion der THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf GAPDH und Ponceau. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6, $p > 0,05$).

Effekte der ER-Aktivierung auf die globale Proteinacetylierung mittels Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion und im Vollzellsat von THP1-Makrophagen

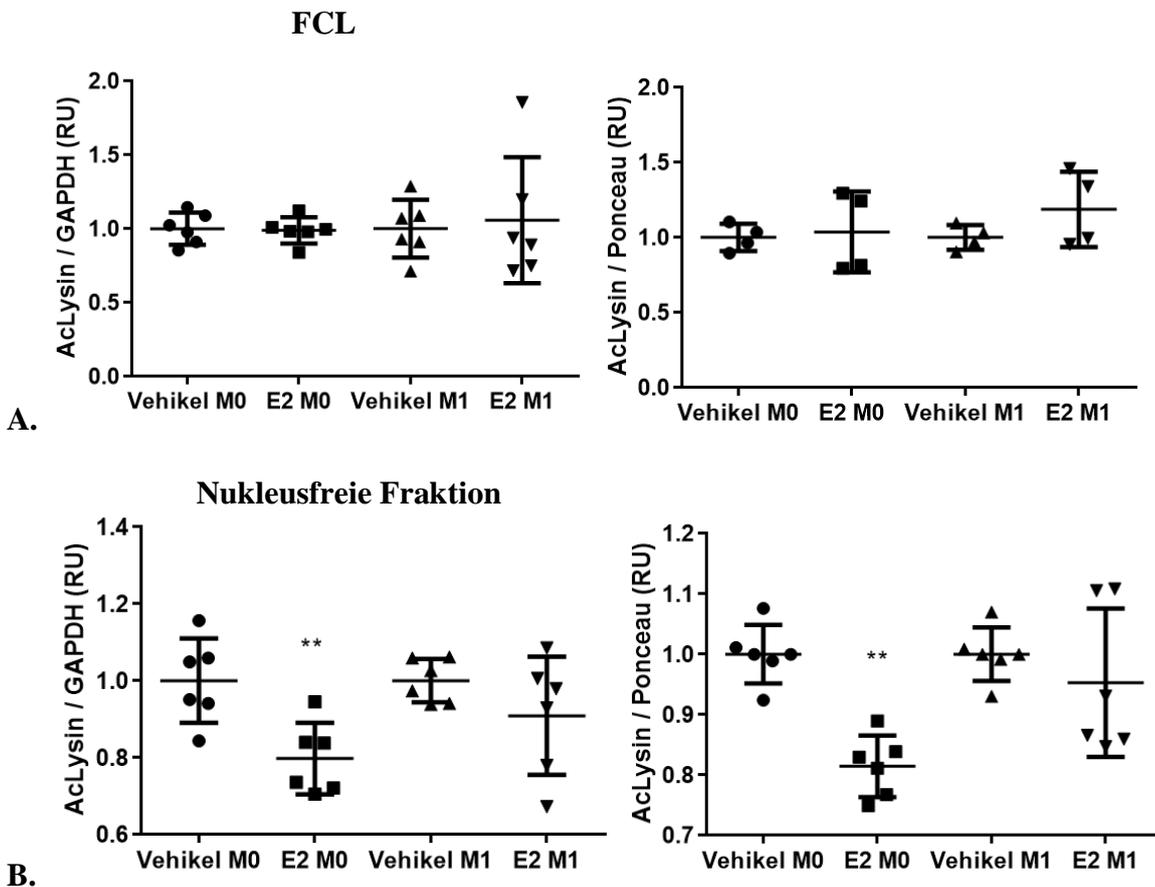


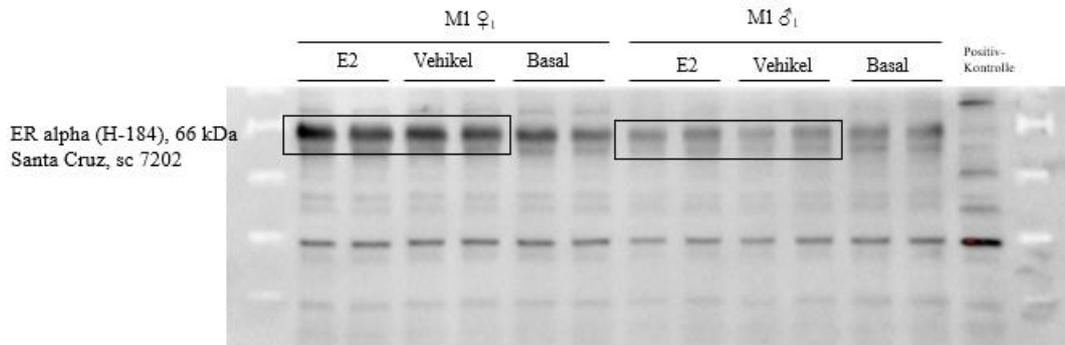
Abbildung 25. Globale Proteinacetylierung mittels Acetylierung von Lysin in THP1-Makrophagen.

A. Statistische Analyse der Acetylierung von Lysin im Vollzelllysate von THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf GAPDH und Ponceau. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6 und $p > 0,05$ für GAPDH; n=4 und $p > 0,05$ für Ponceau, da 2 Individuen nicht auswertbar im Ponceau-Bild).

B. Statistische Analyse der Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion der THP1-Makrophagen, stimuliert mit E2 (10 nmol/L, 24 h), normalisiert auf GAPDH und Ponceau. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6, $**p < 0,001$ bei GAPDH und bei Ponceau).

Vollständige Western-Blot-Membranen

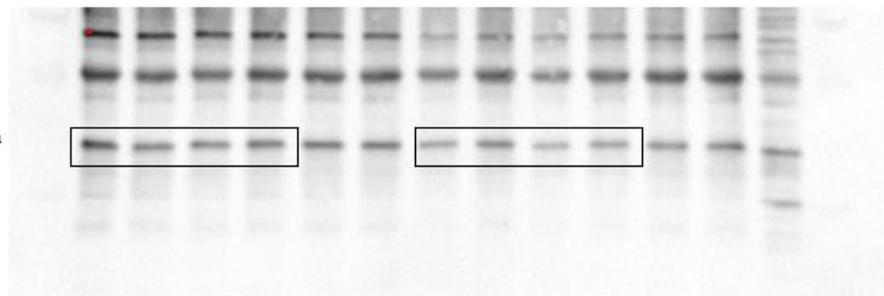
Östrogen-Rezeptoren in primären humanen Makrophagen



ERβ (1531), 56 kDa
Santa Cruz, sc-53494



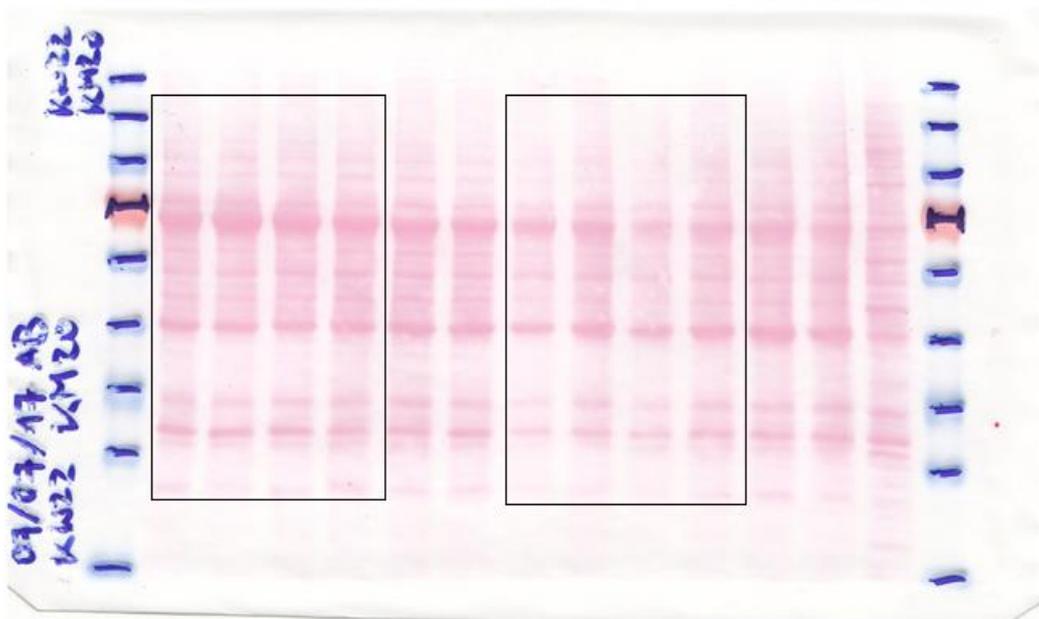
GPR30 (N-15), 38 kDa
Santa Cruz, sc-48525



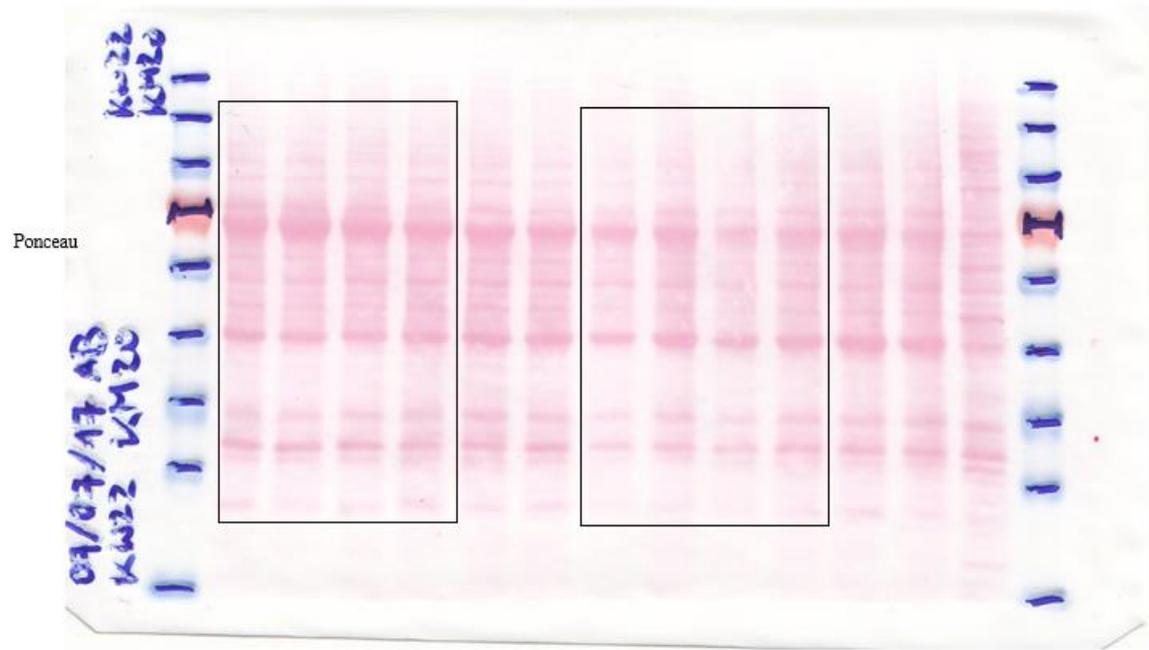
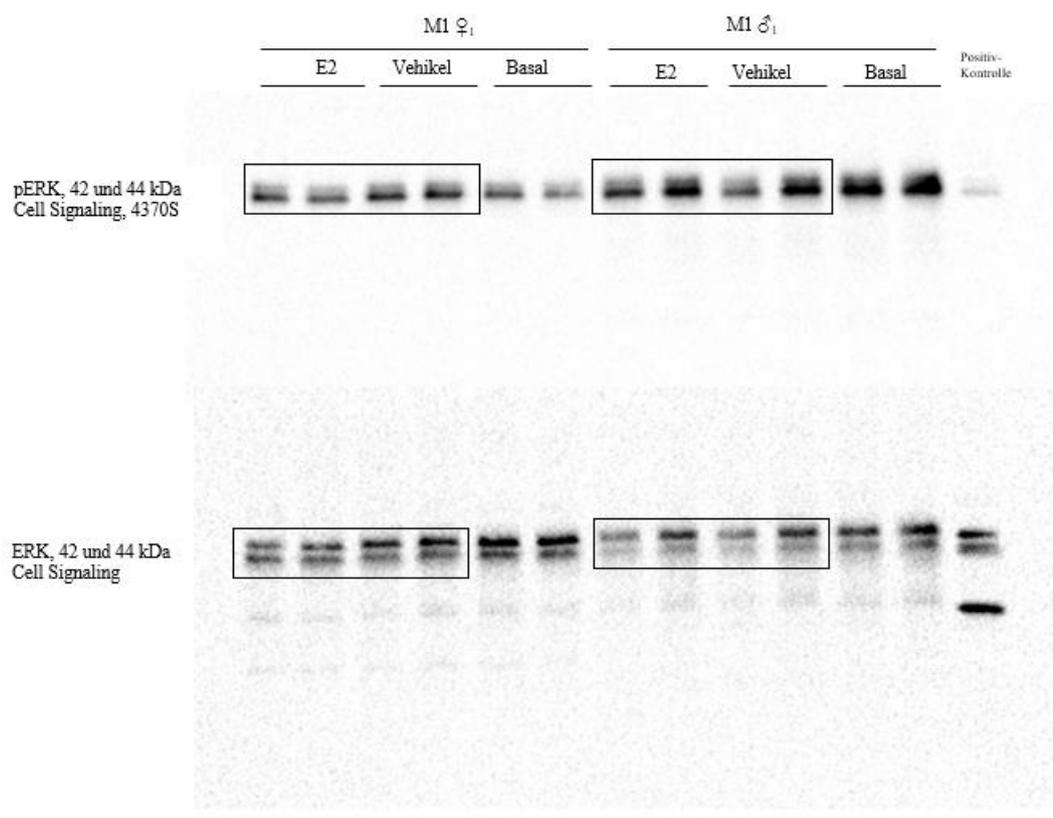
Tubulin, 50 kDa
Sigma, T9026



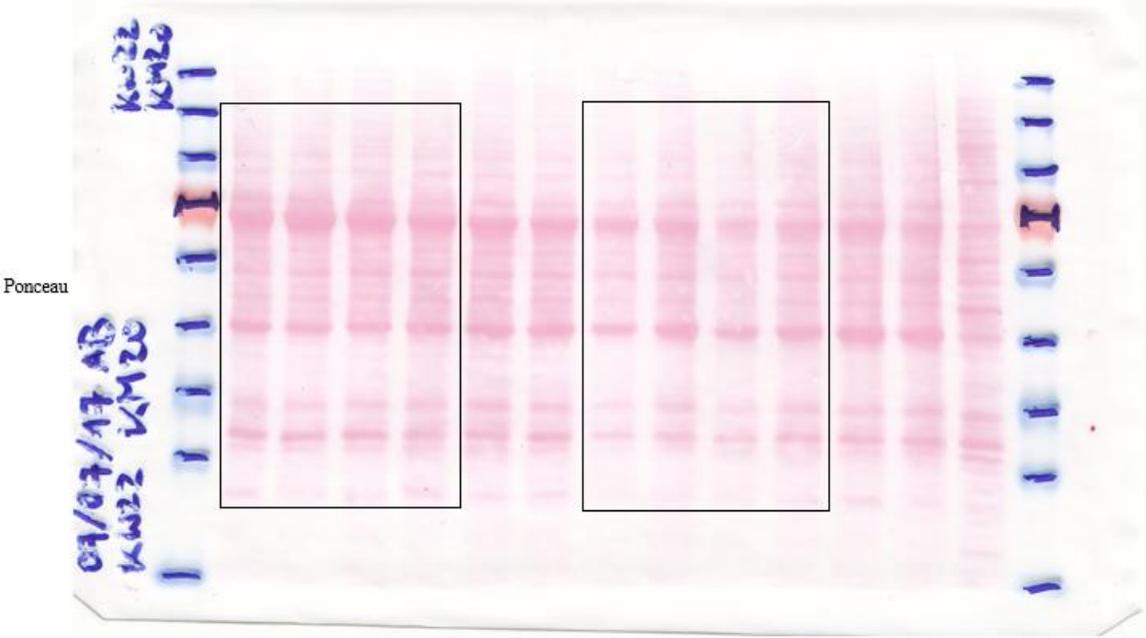
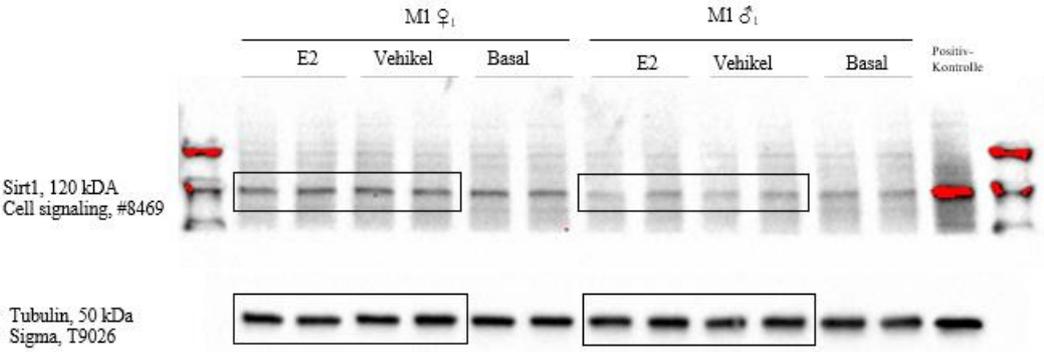
Ponceau



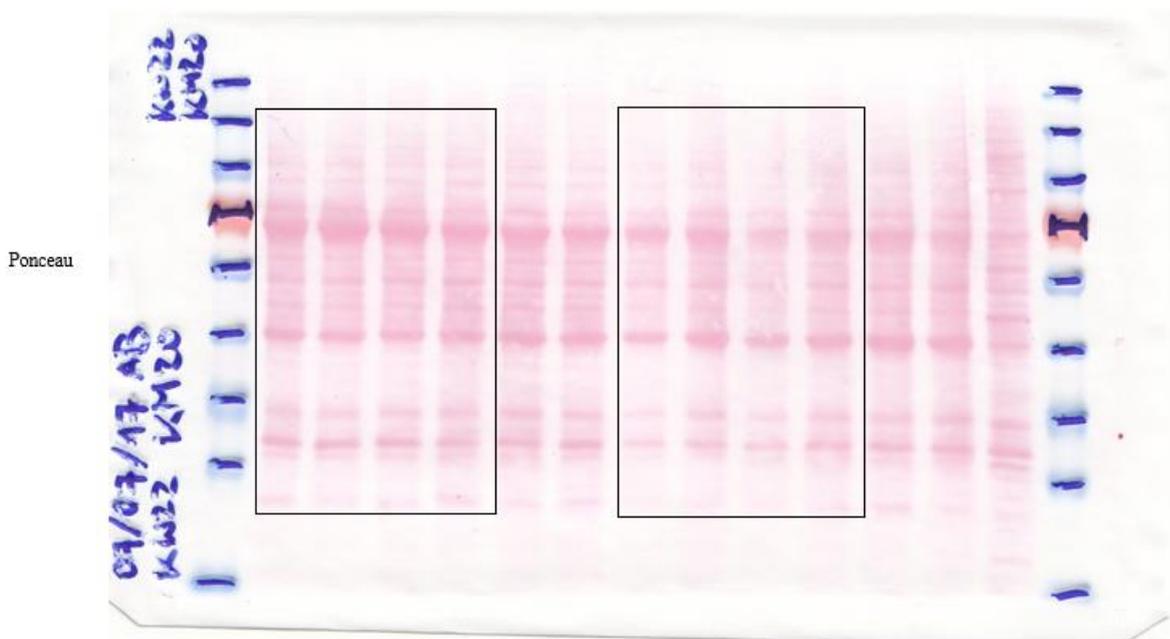
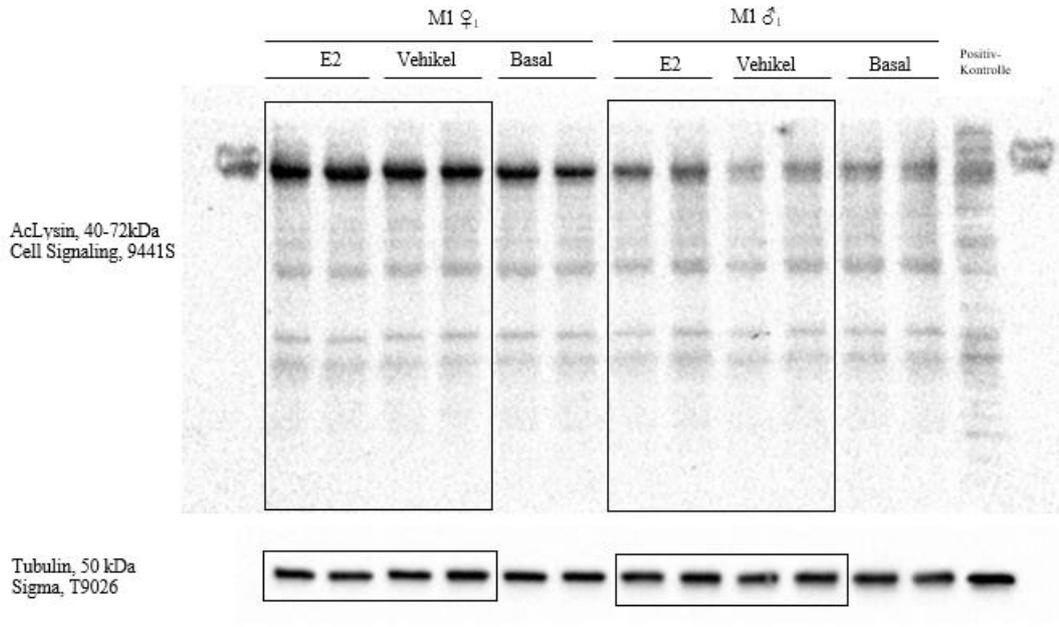
Phosphorylierung von ERK nach Behandlung mit E2



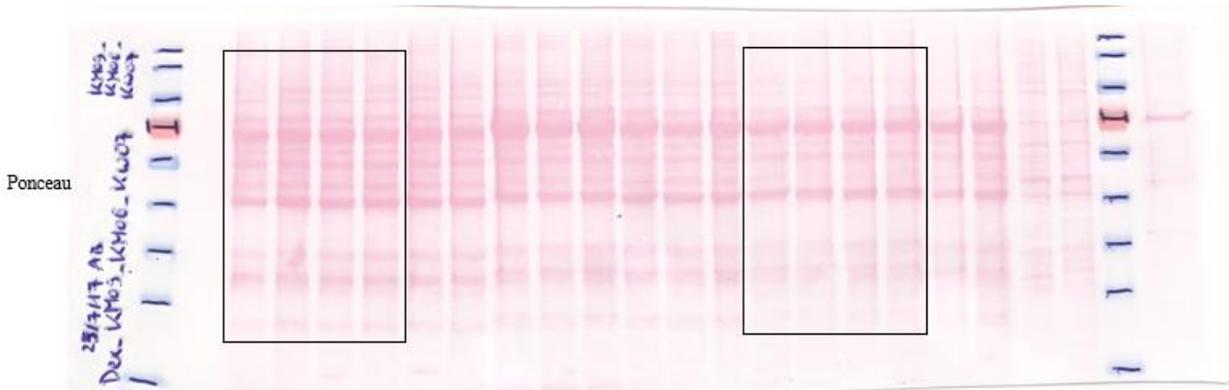
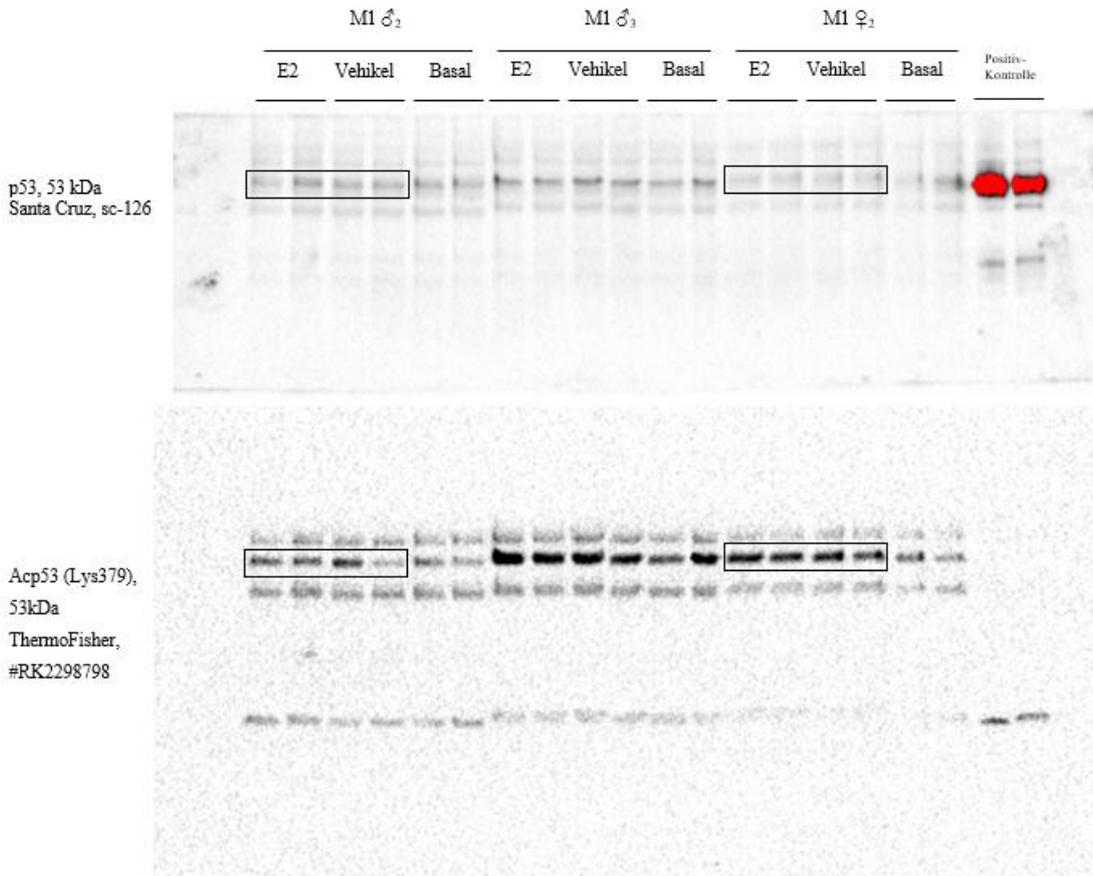
Sirt1-Proteinmenge, M1-differenzierte primären humanen Makrophagen



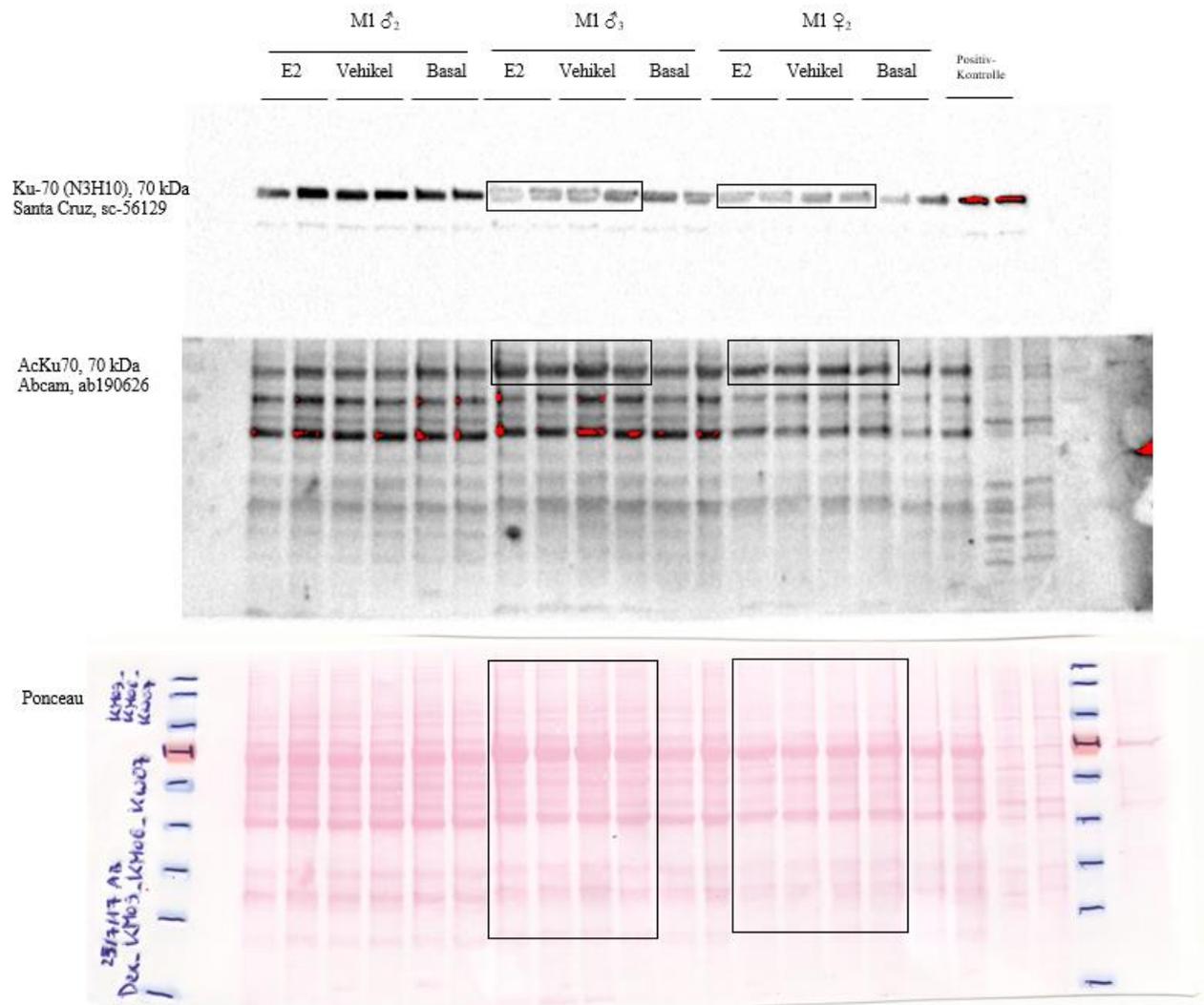
Acetylierung der Lysinreste, M1-differenzierte primären humanen Makrophagen



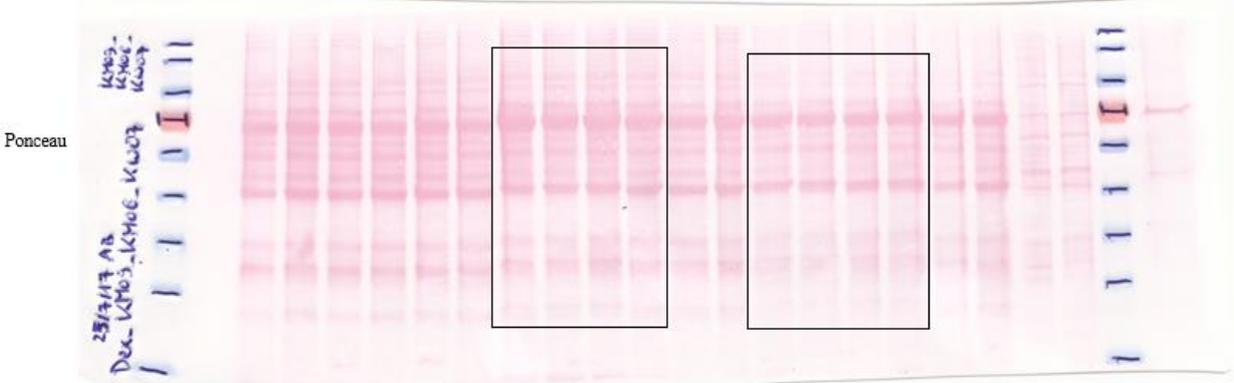
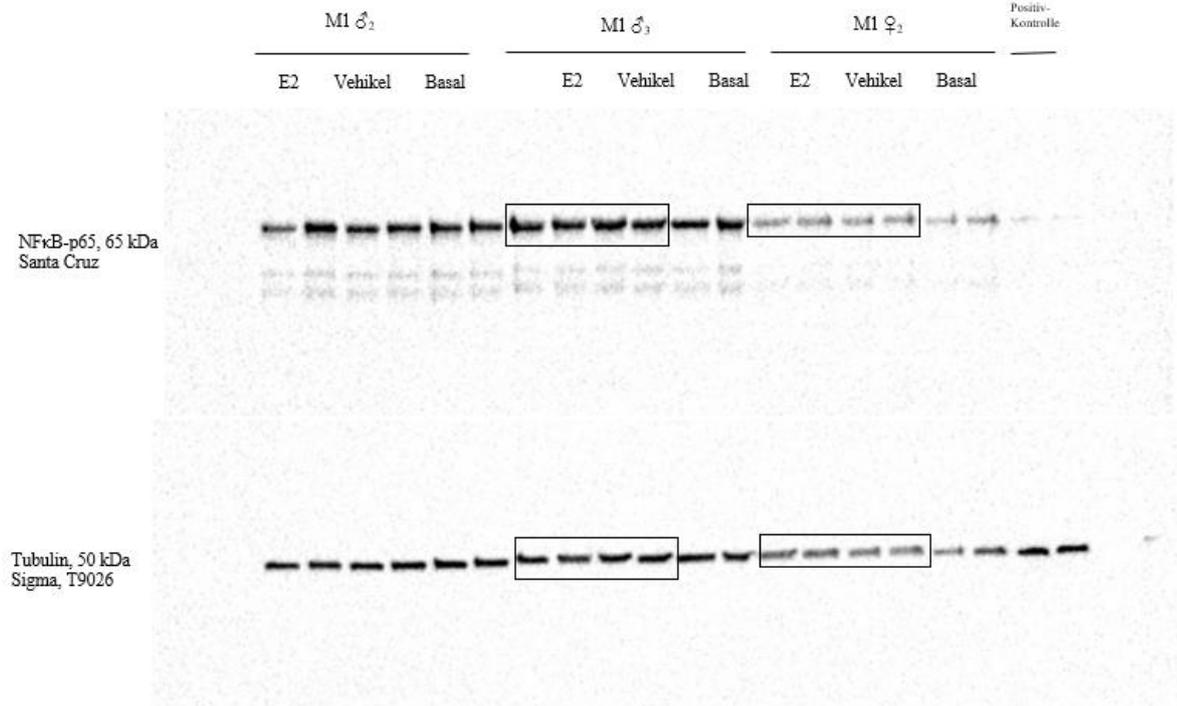
Acetylierung von p53, M1-differenzierte primären humanen Makrophagen



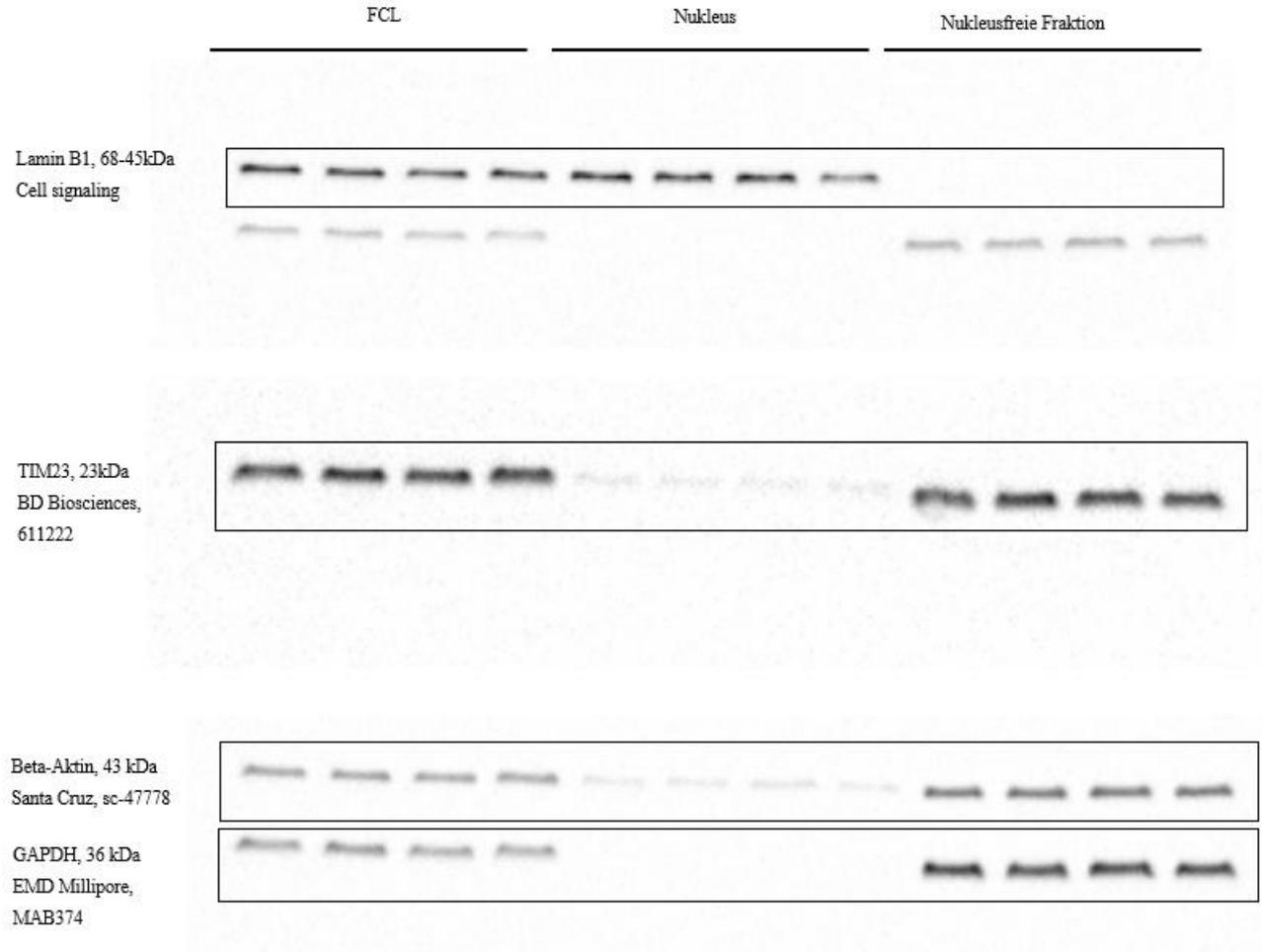
Acetylierung von Ku70, M1-differenzierte primären humanen Makrophagen



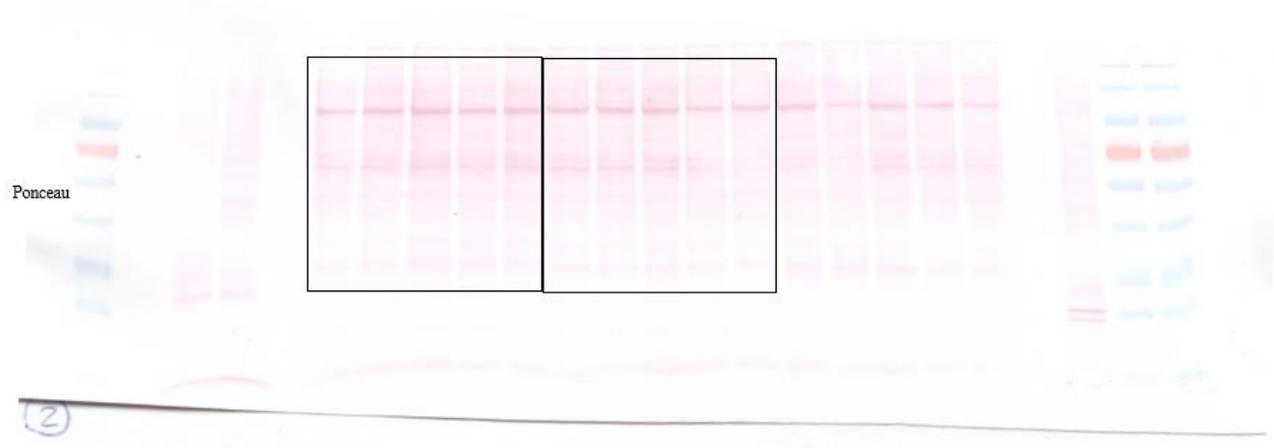
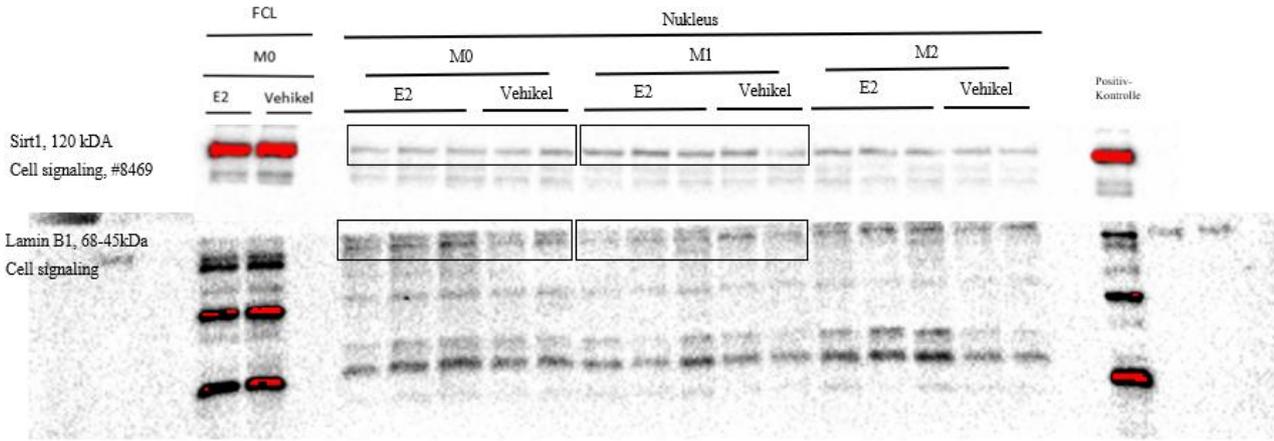
Proteinmenge der p65-Untereinheit des NFκB, M1-differenzierte primären humanen Makrophagen



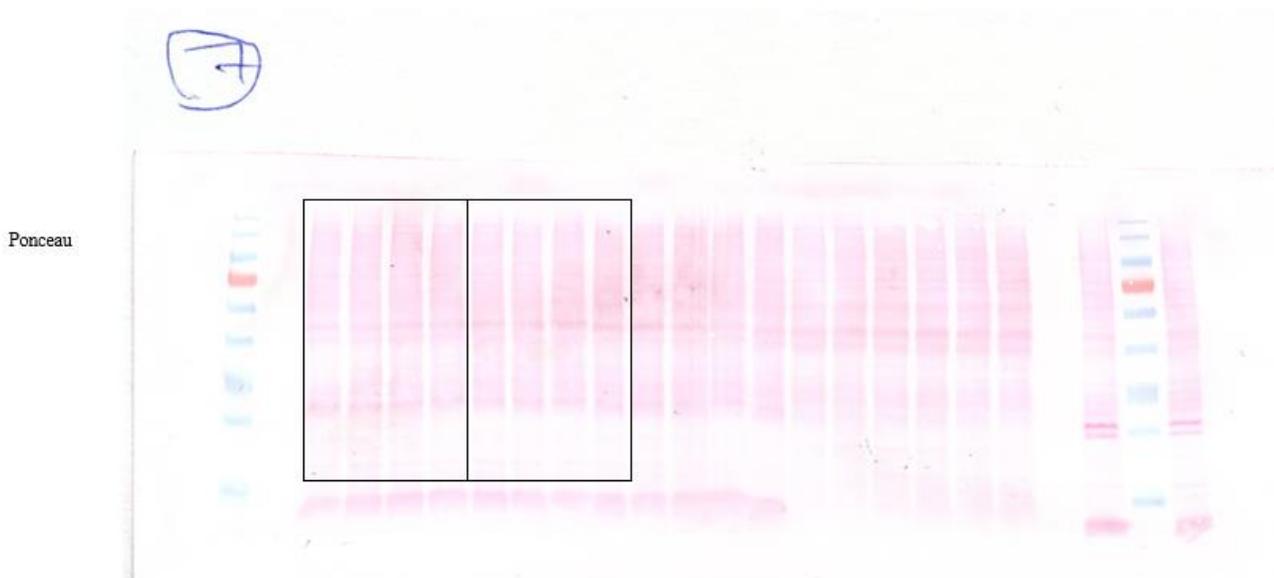
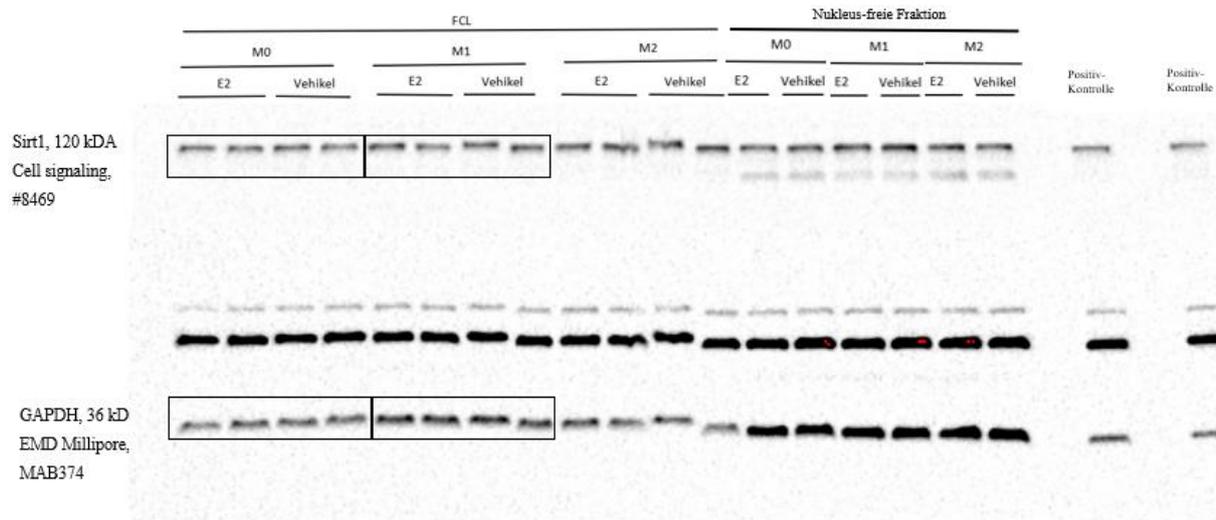
Nachweis der Isolation von reinen intakten Kernen und der nukleusfreien Fraktion aus THP1-Zellen



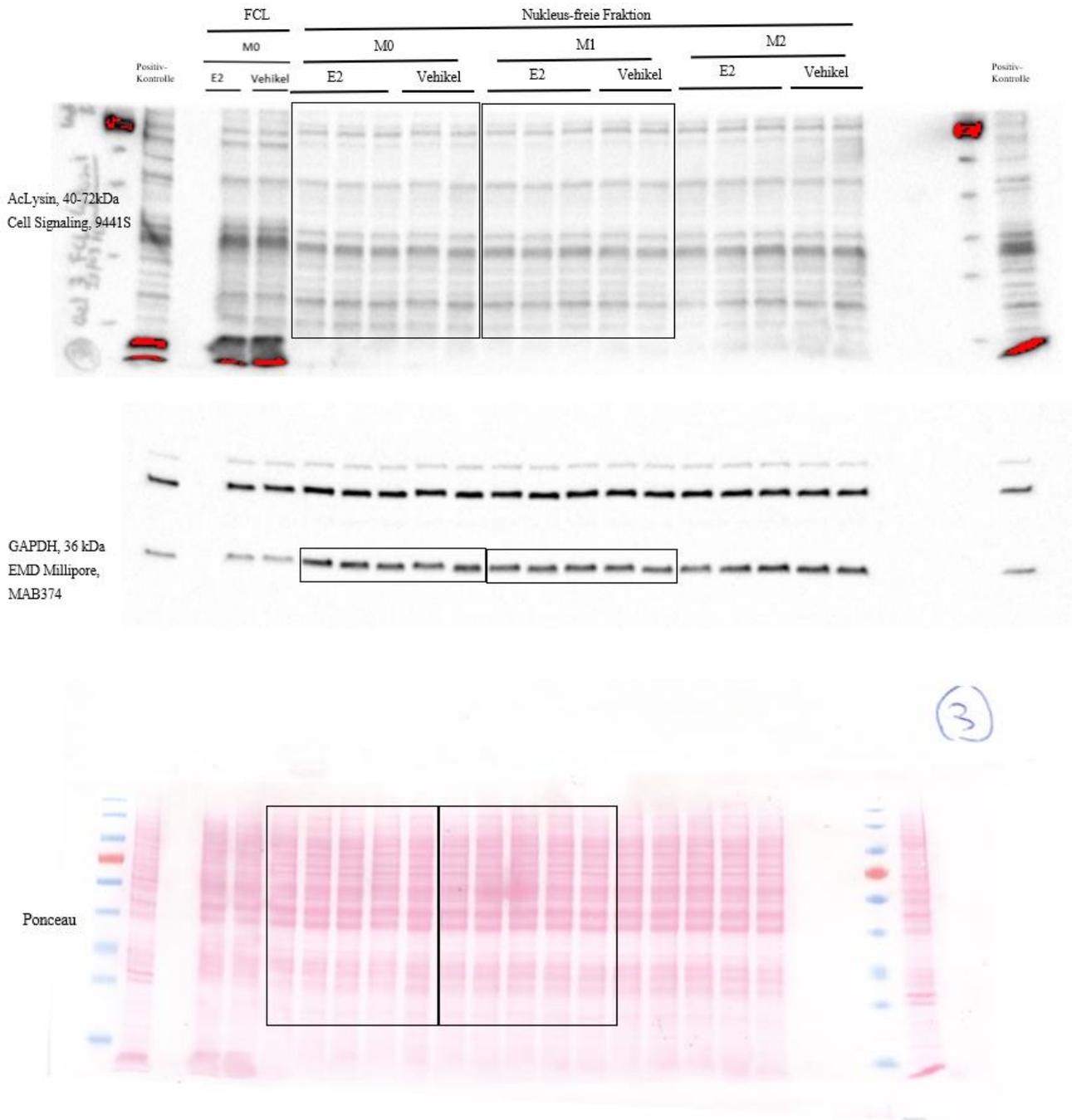
Sirt1-Proteinmenge in der nukleären und nukleusfreien Fraktion sowie im Vollzellsat von THP1-Makrophagen

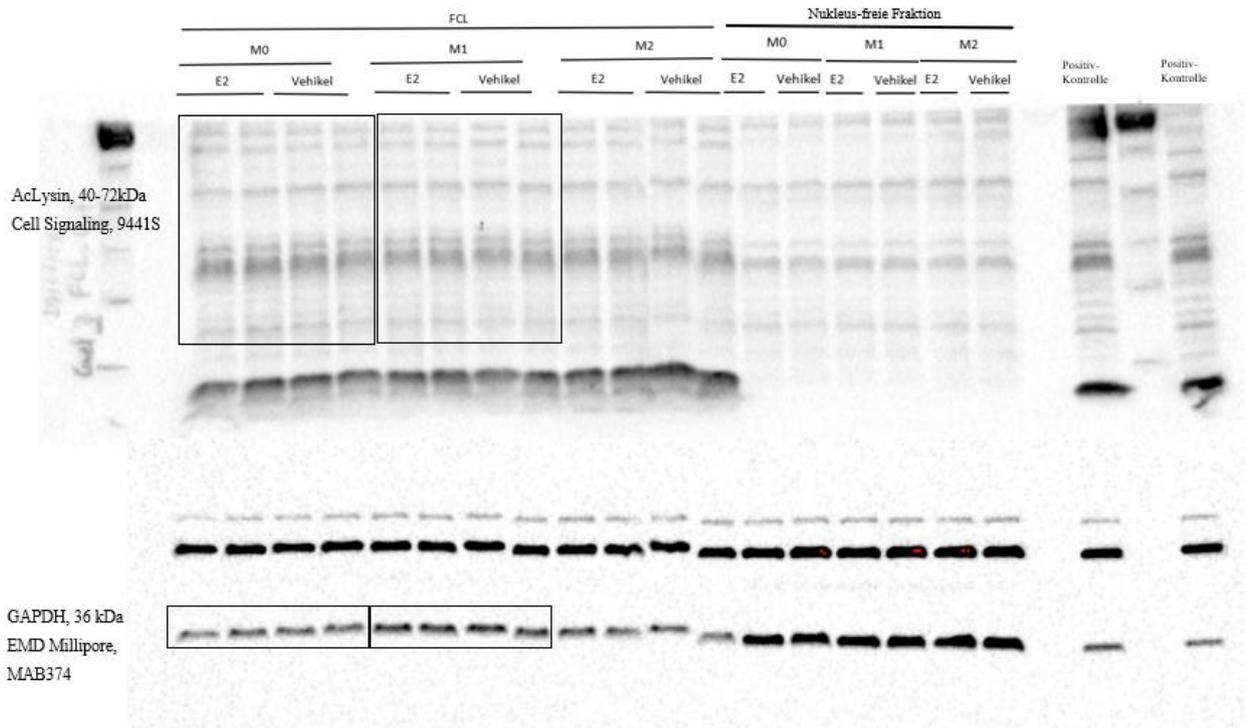


②



Acetylierung von Lysin in der nukleusfreien Fraktion und im Vollzellslysat von THP1-Makrophagen





Acetylierung von Ku70 in der nukleären Fraktion und im Vollzellsat von THP1-Makrophagen

