

**Klonierung und funktionelle Analyse der 5'-flankierenden Region des
humanen kardialen ER α -Gens**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stephan Fritschka
aus Berlin

Dezember 2008

Die Arbeit wurde vom 31.12.2004 bis 10.12.2008 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek am Berliner Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM) der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Schuster

Disputation am: 13.03.2009

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	8
1.1 Östrogen und Östrogenrezeptoren.....	8
1.2 Bedeutung der ER-Expression für Erkrankungen und ihre Therapie.....	10
1.3 Transkription des ERα-Gens	11
1.3.1 Grundlegende Mechanismen der Transkriptionskontrolle	11
1.3.2 Alternatives Spleißen im kodierenden Bereich des ER α -Gens	12
1.3.3 Alternatives Spleißen im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) des ER α -Gens	13
1.3.4 Gewebe- und zellspezifische Aktivität von ER α	15
1.3.5 Regulation der ER α -mRNA-Transkription durch <i>cis</i> - und <i>trans-acting</i> Elemente.	15
1.3.6 Einfluss von E2 auf die ER α -Expression	17
1.4 Ziel der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Puffer	18
2.1.3 Bakterienmedien.....	19
2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze.....	19
2.1.5 Kits.....	20
2.1.6 Enzyme.....	20
2.1.7 Oligonukleotide	20
2.1.8 Primäre Antikörper.....	21
2.1.9 Sekundäre Antikörper	21
2.1.10 Plasmide und Konstrukte.....	21
2.1.11 Bakterienstämme.....	22
2.1.12 Zelllinien.....	22
2.1.13 Patientengut zur Gewinnung von Gesamt-RNA	22
2.1.14 Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.15 Geräte	23
2.1.16 Software.....	23
2.1.17 Statistik	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 RNA-Isolierung aus humanem Myokardgewebe des linken Ventrikels	24
2.2.2 RNA-Isolierung aus Zellen.....	24

2.2.3	Reverse Transkription.....	24
2.2.4	Isolierung genomischer DNA aus Zellen und aus humanen Blutproben	25
2.2.5	Qualitative und quantitative Nukleinsäurebestimmung	25
2.2.6	Ligation, Transformation von <i>E. coli</i> und Plasmid-DNA-Isolierung	25
2.2.7	Herstellung von Glycerinkulturen.....	26
2.2.8	Restriktion von Plasmid-DNA	26
2.2.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	26
2.2.10	5'-RACE	26
2.2.11	<i>Splicing by overlap extension</i> (SOE)	29
2.2.12	Semiquantitative PCR.....	31
2.2.13	Herstellung der Expressionskonstrukte der einzelnen hER α -Promotorvarianten A, B, C und F	32
2.2.14	Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR	33
2.2.15	Nachweis der 5'-UTRs der unterschiedlichen Promotorvarianten des humanen ER α -Gens in AC16-Zellen	34
2.2.16	Nachweis des ER α - und ER β -Gens in AC16-Zellen	34
2.2.17	Sequenzierung.....	34
2.2.18	Zellkultur	35
2.2.18.1	Kulturbedingungen der AC16-Zellen und MCF-7-Zellen.....	35
2.2.18.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	35
2.2.18.3	Transiente Transfektion von AC16-Zellen	36
2.2.18.4	Transiente Transfektion von AC16-Zellen mit hESR1-F(-910/-9)-pGL2 und anschließende Behandlung mit Parthenolid	36
2.2.18.5	Untersuchung der Parthenolid-Wirkung auf die Translokation von NF- κ B p50 in AC16-Zellen	37
2.2.18.6	Kulturbedingungen der AC16-Zellen für die transiente Kotransfektion und anschließende Behandlung mit E2	37
2.2.18.7	Bestimmung der Transfektionseffizienz von AC16-Zellen mit einem GFP- kodierenden Plasmid und Nachweis des Proteins durch Fluoreszenzmikroskopie	38
2.2.19	Luciferase-Reporter-Assay	39
2.2.20	Isolierung des nukleären Extraktes aus AC16-Zellen.....	39
2.2.21	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	40
2.2.22	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.2.23	Coomassie Brilliant Blue-Färbung	41
2.2.24	Western Blot	41
2.2.25	Ponceau-Färbung	42

2.2.26	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	42
2.2.27	Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie	43
2.2.28	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA) und <i>Supershift-Assay</i>	44
2.2.28.1	Radioaktive Markierung doppelsträngiger Oligonukleotide.....	44
2.2.28.2	EMSA/ <i>Supershift-Assay</i>	45
2.2.29	<i>Shift-Western</i>	46
2.2.30	<i>Self-primed PCR</i>	47
2.2.31	Affinitätschromatographie	48
2.2.32	Silberfärbung von Proteinen	50
2.2.33	Massenspektrometrie	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Identifizierung und Charakterisierung der ERα-Promotorvarianten im humanen Myokard.....	51
3.1.1	Nachweis der verschiedenen 5'-UTR-Varianten.....	52
3.1.2	Direkter PCR-Nachweis der 5'-UTR-Varianten.....	53
3.1.3	Identifizierung der dominanten Promotorvariante.....	53
3.2	AC16-Zellen als <i>in vitro</i>-Modell	54
3.2.1	Nachweis der Genexpression von ER α und ER β in AC16-Zellen.....	55
3.2.2	Identifizierung der 5'-UTR-Varianten von ER α in AC16-Zellen	56
3.2.3	Bestimmung der Transfektionseffizienz von AC16-Zellen.....	57
3.3	Funktionelle Analyse des F-Promotors	58
3.3.1	Expressionskonstrukte der hER α -F-Promotorvariante	58
3.3.2	Bestimmung der humanen ER α -F-Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporter-Assay.....	61
3.3.3	Analyse putativer Bindungsstellen innerhalb des F-Promotors	63
3.3.4	Untersuchung der suppressorischen Wirkung potentieller Transkriptionsfaktoren	64
3.3.5	Analyse des humanen ER α -F-Promotors mittels EMSA und <i>Supershift-Assays</i>	65
3.3.5.1	EMSA/ <i>Supershift-Assay</i> mit einem Antikörper gegen NF- κ B p50	66
3.3.5.2	EMSA/ <i>Supershift-Assays</i> mit Antikörpern gegen NF- κ B p65 und CDP.....	68
3.3.6	Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion mittels Affinitätschromatographie	70
3.3.6.1	Identifizierung der DNA-bindenden Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie	71
3.3.6.2	EMSA/ <i>Supershift-Assay</i> mit Prohibitin.....	72
3.3.7	Bindungsstudien des Oligonukleotids hESR1-F-oligo-lang-WT mit AC16-Zellkernextrakten mittels <i>Shift-Western</i>	74

3.4	Einfluss von NF-κB auf den F-Promotor	76
3.4.1	Inhibition von NF- κ B durch Parthenolid	77
3.4.2	Effekt von Parthenolid auf die Translokation von NF- κ B p50	78
3.4.3	Erhöhung der ER α -Expression durch die Inhibierung von NF- κ B	80
3.5	Einfluss von 17β-Östradiol auf die Aktivität von verschiedenen hERα- Promotorvarianten in AC16-Zellen	81
4	Diskussion	84
4.1	Charakterisierung der 5'-UTRs und Promotorsequenzen des humanen kardialen ERα-Gens	85
4.2	Funktionelle Analysen des hERα-F-Promotors	86
4.2.1	Bindung von NF- κ B p50 an den humanen ER α -F-Promotor	90
4.3	Inhibition von NF-κB führt zur Erhöhung der Aktivität des hERα-F-Promotors...	92
4.4	Effekt von E2 auf die Aktivität der verschiedenen Promotorvarianten von hERα	95
5	Zusammenfassung	98
6	Summary	99
7	Literatur	100
8	Anhang	115
9	Publikationen	118
10	Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α-MHC	alpha myosin heavy chain (engl.)
β-MHC	beta myosin heavy chain (engl.)
[γ ³² P]-ATP	[gamma ³² P]-Adenosin-5'-Triphosphat
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
³² P	radioaktives Phosphor-Isotop mit der Massezahl 32
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein 1
AS	Aortenklappenstenose
BAFs	Brg-1-associated factors (engl.)
<i>bidest.</i>	<i>bidestillata</i> (lat.) = doppelt destilliert
bp	base pairs (engl.) = Basenpaare
Brg-1	brahma-related gene 1 (engl.)
Brm	brahma (engl.)
bzw.	beziehungsweise
BSA	bovine serum albumin (engl.) = Rinderserumalbumin
c. s.	charcoal stripped (engl.)
ca.	circa
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (engl.) = komplementäre DNA
CDP	CCAAT displacement protein (engl.)
cGMP	cyclic guanosine-3',5'-monophosphate (engl.) = zyklisches Guanosin-3',5'- Monophosphat
cm	centimeter (engl.) = Zentimeter
Cy-3	Carbocyanin
Cx-40	connexin 40 (engl.)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
DCM	dilative cardiomyopathy (engl.) = dilatative Kardiomyopathie
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (engl.)
DNA	desoxyribonucleic acid (engl.) = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	17 β -estradiol (engl.) = 17 β -Östradiol
EDTA	ethylenediaminetetraacetate (engl.) = Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	aus dem Englischen
ER	estrogen receptor(s) (engl.) = Östrogenrezeptor(en)
ER β	estrogen receptor beta (engl.) = Östrogenrezeptor beta
ER α , ESR1	estrogen receptor alpha (engl.) = Östrogenrezeptor alpha
ERE	estrogen responsive element (engl.) = Östrogen-responsives Element
<i>et al.</i>	et alii (lat.) = und andere
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FW-Primer	forward primer (engl.) = Vorwärtsprimer
g, mg, μ g, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GATA4	GATA-bindendes Protein 4
GSP	genspezifische Primer
h	Stunde(n)
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HM	Hungermedium
HPLC	high performance liquid chromatography (engl.) = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I κ B	inhibitors of nuclear factor-kappaB (engl.)
IKK	inhibitors of nuclear factor-kappaB kinase complex (engl.)
IL-1 β	Interleukin 1 beta
Kap.	Kapitel
kb	Kilo base pairs (engl.) = Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB-Medium	Lennox broth (engl.)-Medium
Luc	Luciferase
M	Molarität, Mol pro Liter
mA	Milliampere
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
mm	Millimeter
mM, μ M	Millimolar, Mikromolar
mRNA	messenger ribonucleic acid (engl.) = Boten-Ribonukleinsäure
MW	molecular weight (engl.) = Molekulargewicht
MYCD	myocardin (engl.)
n	Anzahl
NF- κ B	nuclear factor-kappaB (engl.) = nukleäre Faktor-kappaB
NFAT	nuclear factor of activated T-cells (engl.) = nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen

NRE	nuclear factor- κ B responsive element
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline (engl.) = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (engl.) = Polymerasekettenreaktion
PHB	Prohibitin
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Phenolrot
RACE	rapid amplification of cDNA ends (engl.)
RNA	ribonucleic acid (engl.) = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RV-Primer	reverse primer (engl.) = Rückwärtsprimer
s	Sekunde(n)
SDS	sodiumdodecylsulfate (engl.) = Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean (engl.) = Standardfehler des Mittelwertes
SMARCA3	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator chromatin, subfamily A, member 3 (engl.)
SOE	splicing by overlap extension (engl.)
SP1	specificity protein 1, Sp1 transcription factor (engl.) = Sp1 Transkriptionsfaktor
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-binding protein (engl.) = TATA-bindendes Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
U	unit (engl.) = Einheit der Enzymaktivität
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
UTR	untranslated region (engl.) = untranslatierte Bereich
V	Volt
v/v	volume per volume (engl.) = Volumen pro Volumen
VM	Vollmedium
Vol	Volumenäquivalent
w/v	weight per volume (engl.) = Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	mal Erdbeschleunigung [9,18 m x s ⁻²]
z. b.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Östrogen und Östrogenrezeptoren

Östrogene, von denen das Steroidhormon 17 β -Östradiol (E2) die aktivste Form ist, spielen in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle, beispielsweise bei der Reproduktion, im Knochenstoffwechsel sowie im neuroendokrinen und kardiovaskulären System¹. E2 übt seine Wirkung überwiegend durch die Bindung an die nukleären Östrogenrezeptoren (ER) alpha (α) und beta (β) aus, die als Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren nach ihrer Aktivierung Homo- oder Heterodimere bilden und die Regulation zahlreicher Zielgene beeinflussen. E2 kann seine Wirkung auf genomischen Wege über intrazelluläre ER entfalten oder auf dem nichtgenomischen Weg über membranständige ER, wodurch E2 eine Vielzahl von zytoplasmatischen Signalkaskaden aktiviert. Die Expression beider ER konnte bei Mensch und Nager in reproduktiven Geweben und darüber hinaus in anderen Organsystemen nachgewiesen werden. Im kardiovaskulären System gehören dazu die kardialen Fibroblasten und Myozyten sowie die Endothelzellen und die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur²⁻⁷. Östrogene zeigen an der Gefäßwand sowohl schnelle nichtgenomische als auch langsame genomische Effekte. Zu den Kurzzeiteffekten gehören antioxidative Mechanismen, die Beeinflussung des endothelabhängigen Stickoxids und damit verbunden ein cGMP-Anstieg mit anschließender Gefäßrelaxation sowie eine Kalzium-Kanalblockade. Zu den Langzeiteffekten gehört die Expression bestimmter Gefäßproteine, die entweder über ER α , ER β oder über beide Rezeptor-Isoformen vermittelt wird⁸. So trägt der über ER-vermittelte Langzeiteffekt von E2 unter anderem zur Prävention von Arteriosklerose bei und minimiert die Zellantwort auf eine Gefäßverletzung⁹.

Das E2 wird primär in den Ovarien, aber in deutlich geringeren Mengen auch in den männlichen Geschlechtsorganen, den Hoden, synthetisiert. Mit zunehmendem Alter produziert der Körper immer weniger E2, und das Absinken des Hormonspiegels wurde unter anderem mit der Pathogenese vieler Krankheiten wie beispielsweise Alzheimer, Osteoporose und verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Verschiedene Studien zeigen, dass das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen abhängig von Alter und Geschlecht der Betroffenen ist¹⁰. Prämenopausale Frauen weisen eine deutlich geringere Inzidenz für Arteriosklerose im Vergleich zu gleichaltrigen Männern auf. Nach der Menopause ist jedoch das Auftreten kardialer Erkrankungen bei Frauen wesentlich stärker ausgeprägt als bei gleichaltrigen Männern⁸. Die Hormonersatztherapie, die vorzugsweise aus einer Kombination von Östrogenen und Gestagenen bestand, galt lange Zeit als ein probates Mittel, das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nach der Menopause zu senken^{11, 12}. Im

Gegensatz dazu konnten in den zwei bisher größten kontrollierten klinischen Studien, der HERS-Studie (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*) und der nachfolgenden WHI-Studie (*Women's Health Initiative*), keine positiven Effekte bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen werden¹³⁻¹⁶. Es gibt Hinweise darauf, dass sich zum einen die Hormonersatztherapie bei jüngeren Frauen, die sich in der Perimenopause befinden, positiv auswirkt, jedoch bei älteren, postmenopausalen Frauen nicht mehr, und dass zum anderen die Hormontherapie vor allem dann ungünstig wirkt, wenn bereits eine arteriosklerotische Erkrankung besteht¹.

Ausgehend von Untersuchungen zur spezifischen Bindung von E2 im Uterus von Ratten, kamen Jensen und Jacobsen¹⁷ zu der Überzeugung, dass der Effekt von E2 nur durch das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptorproteins erklärt werden kann. Viele Jahre lang war dieses Protein Gegenstand intensiver Forschung^{18, 19}. 1986 berichteten zwei Arbeitsgruppen über die erfolgreiche Klonierung des ER^{20, 21}. Bis 1995 wurde allgemein angenommen, dass nur eine Rezeptor-Isoform für die Vermittlung der physiologischen und pharmakologischen Effekte von natürlichem und synthetischem E2 verantwortlich ist. Erst im Jahr 1995 wurde ein zweiter ER (ER β) aus der cDNA einer Ratten-Prostata kloniert²². Der ursprüngliche ER wurde daraufhin in ER α umbenannt.

Das Gen für den humanen ER α ist auf dem langen Arm des Chromosom 6 (6q25.1) lokalisiert²³ und erstreckt sich über eine Länge von über 140 kb mit einer kodierenden Region, die sich aus acht Exons zusammensetzt²⁴. Die cDNA besteht aus 1785 Nukleotiden, die für 595 Aminosäuren kodieren und ein Molekulargewicht von 66 kDa ergeben^{21, 25}. Das Gen des humanen ER β befindet sich auf Chromosom 14 (14q22-q24). Das Polypeptid besteht aus 530 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 59 kDa^{26, 27}.

Wie bei allen Mitgliedern der nukleären Hormonrezeptor-Superfamilie handelt es sich bei den ER um ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren. Ähnlich wie andere Mitglieder der Rezeptor-Familie sind die beiden ER-Proteine α und β aus sechs verschiedenen Domänen (A-F) zusammengesetzt²⁸. Die einzelnen Domänen können in drei unabhängige, aber miteinander agierende Funktionsdomänen eingeteilt werden: die N-terminale oder A/B-Domäne, die C- oder DNA-Bindungsdomäne und die D/E/F- oder Liganden-Bindungsdomäne²⁹. Die Bindung eines Liganden an den ER bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors und führt über zahlreiche Zwischenschritte zu einer veränderten Transkriptionsrate der durch ER regulierten Gene. Die einzelnen Zwischenschritte sind noch nicht vollständig verstanden, aber sie beinhalten Rezeptor-Dimerisation, Rezeptor-DNA-Interaktion,

Rekrutierung von und Interaktion mit Koaktivatoren, Korepressoren und anderen Transkriptionsfaktoren und Bildung des Prä-Initiationskomplexes³⁰⁻³⁷.

1.2 Bedeutung der ER-Expression für Erkrankungen und ihre Therapie

Welche regulativen Mechanismen den Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) durch Östrogen-Stimuli auf Transkriptionsebene zugrunde liegen, ist noch nicht genau bekannt. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass Zell- und Gewebetyp einen entscheidenden Einfluss auf die Expressionsaktivität von ER α haben³⁸⁻⁴³. So führt E2 in MCF-7-Zellen zu einer Verringerung der ER α -Expression und in anderen Zelllinien, wie z. B. FEM-19, ZR-75, T47-D und in der Leber, zu einer erhöhten ER α -mRNA-Expression. Ein hoher Level an exogenem Östrogen ist direkt assoziiert mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko⁴⁴. Dabei ist der ER-Status ein wichtiger Anhaltspunkt für die weitere Prognose. Bei über der Hälfte aller Brustkrebserkrankungen ist ER α überexprimiert⁴⁵, und der Behandlungserfolg dieser ER-positiven Tumore ist in der Regel durch eine Antiöstrogen-Behandlung (z. B. Tamoxifen) und/oder eine Hormon-Reduktionstherapie mit Aromatase-Inhibitoren deutlich besser als der ER-negativer Tumore⁴⁶.

Einige Studien haben gezeigt, dass die Expression von ER α in humanem linksventrikulärem Gewebe sowohl in Patienten mit Aortenklappenstenose (AS) als auch in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) krankheitsabhängig reguliert wird^{4, 6}. Dem liegt möglicherweise ein Kompensationsmechanismus zugrunde, wobei die bei AS- und DCM-Patienten zu beobachtende Hochregulation von ER α die Funktion haben könnte, speziellen pathogenen Stimuli entgegenzuwirken. Eine Verstärkung dieses Mechanismus lässt ihn für einen Therapieansatz interessant erscheinen.

Losordo und Kollegen fanden erste Hinweise auf eine verminderte Zahl der koronarvaskulären Östrogenrezeptoren bei koronarer Arteriosklerose⁴⁷. Dieser Umstand erklärt möglicherweise das schlechte Ansprechverhalten des arteriosklerotischen Gewebes auf einen Östrogen-Stimulus. Die *timing hypothesis* propagiert nicht zuletzt aus diesem Grund, dass die Hormontherapie vor dem Beginn arteriosklerotischer Veränderungen erfolgen sollte¹.

1.3 Transkription des ER α -Gens

1.3.1 Grundlegende Mechanismen der Transkriptionskontrolle

Aus mehreren Gründen ist die Regulation der Transkription von großer Bedeutung für den Organismus. Zum einen muss für den Prozess der Transkription und Translation viel Energie bereitgestellt werden. Die Zelle ist daher bestrebt, diesen Aufwand auf ein Mindestmaß zu beschränken. Durch Veränderung der Transkriptionsrate kann zum anderen die Konzentration eines Enzyms erhöht bzw. erniedrigt werden. Um ihre Funktion zu erfüllen, müssen die verantwortlichen Gene in bestimmten Phasen der Entwicklung aktiviert werden.

Die Genexpression in eukaryontischen Zellen wird auf DNA-Ebene unter anderem durch die unterschiedliche Organisation des Chromatins, den Methylierungsgrad der DNA und durch die Anzahl der Genkopien beeinflusst. Die meisten eukaryontischen Gene, die für mRNAs kodieren, unterliegen dem primären Regulationsmechanismus der Transkription⁴⁸. Die Transkription dieser RNAs erfolgt in aufeinanderfolgenden Phasen (Transkriptionszyklus). Dabei spielen Veränderungen während der Prozesse der Prä-Initiation, Initiation, Promotor-Freigabe, Elongation und Termination eine Rolle, wobei einige Prozesse nacheinander ablaufen, andere zeitgleich⁴⁹. Eine große Bedeutung bei der Kontrolle der Genexpression hat die Transkriptionsinitiation, da deren Effektivität maßgeblich zur Effizienz der Transkription eines Gens beiträgt. Bei Eukaryonten werden die Protein-kodierenden Gene durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Der Bereich eines Gens, an den die RNA-Polymerase II bindet und die Transkription initiiert, wird als Promotor bezeichnet. *Core*-Promotor wird üblicherweise ein DNA-Abschnitt von -30 bp bis +25 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt genannt⁵⁰. Spezifisch erkennbare Sequenzelemente innerhalb des Promotors sind die sogenannte TATA-Box und das Initiator-Element⁵¹⁻⁵³. Diese basalen Promotorelemente dienen der korrekten Positionierung des RNA-Polymerase II-Komplexes. Die RNA-Polymerase bindet dabei jedoch nicht direkt an die TATA-Box, sondern wird von zahlreichen sogenannten allgemeinen Transkriptionsfaktoren (*trans-acting elements*) an den Promotor rekrutiert^{54, 55}. Der Transkriptionsfaktor TFIID bindet dabei als erster und höchstwahrscheinlich als einziger direkt an die DNA und besteht aus dem TATA-Bindungsprotein (TBP) und acht TBP-assoziierten Faktoren⁵⁶⁻⁵⁸. Zwei weitere, vor der TATA-Box lokalisierte DNA-Elemente sind die CCAAT- und die GC-Box, wobei letztere in multiplen Kopien vorkommen kann. Beide sind aber nicht in allen Genen anzutreffen. Die meisten Promotoren von ER α , mit Ausnahme des Promotors T, weisen keine erkennbaren spezifischen Sequenzelemente wie TATA-, CCAAT- oder GC-Box auf⁵⁹. Als Resultat ist der Startpunkt der Transkription bei allen Promotorvarianten nicht sehr strikt, und die ER α -Promotoren weisen in Transkriptionsassays sehr schwache Aktivitäten auf⁶⁰.

Die Wechselwirkung von allgemeinen Transkriptionsfaktoren mit basalen Promotorelementen ist nötig, aber nicht ausreichend, um die Transkriptionsrate zu erhöhen oder zu verringern. Dies wird erst durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Konsensussequenzen (*cis-acting elements*) erreicht, die sich in einigen Fällen mehrere Kilobasen stromaufwärts oder stromabwärts von der Initiationsstelle befinden. Diese Bindung bewirkt die Aktivierung oder Inhibition der Transkription durch positiv- oder negativ-regulatorische Protein-Protein-Wechselwirkungen mit weiteren Faktoren und dem basalen Transkriptionsapparat ⁶¹.

1.3.2 Alternatives Spleißen im kodierenden Bereich des ER α -Gens

Bei dem Gen für ER α handelt es sich um eine komplexe genomische Einheit mit zahlreichen alternativen Spleißmöglichkeiten und gewebespezifischer Promotoraktivität ^{38, 62}. In verschiedenen Geweben und Organismen konnte annähernd jede Möglichkeit des alternativen Spleißens von ER α auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden ⁶³. Alternatives Spleißen und Exon-Skipping findet bei nicht-kodierenden und kodierenden Exons statt. Relativ wenige dieser resultierenden Transkripte können in funktionelle Proteine translatiert werden, wobei das 66 kDa-Protein allgemein als *full length protein* bezeichnet wird. Verglichen mit der Vielzahl der mRNA-Transkripte sind bisher nur wenige entsprechende Proteine bekannt.

Zusätzlich zu dem weit verbreiteten Mechanismus des alternativen *cis-splicing* ist das humane ER α -Gen auch Gegenstand von *trans-splicing*-Ereignissen. Flouriot *et al.* ⁶⁴ konnten in MCF-7-Zellen eine cDNA charakterisieren, bei der die 5'*acceptor splice site* von Exon 1 (Abb. 1), die Stelle, an der die *upstream*-Exons normalerweise alternativ gespleißt werden, direkt an die 3'*donor splice site* eines weiteren Exon 1 gespleißt war. Welche physiologischen und pathophysiologischen Konsequenzen das *trans-splicing* für den Organismus hat, ist unklar, ebenso wie der Mechanismus, der die *trans-splicing*-Aktivität des ER α -Gens moduliert.

1.3.3 Alternatives Spleißen im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) des ER α -Gens

Alternatives Spleißen kommt nicht nur innerhalb der kodierenden Bereiche vor, sondern auch im Promotorbereich des ER α -Gens. Soweit nicht anders angegeben, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Nomenklatur für die 5'-untranslatierten Exons bzw. die Promotoren von Kos *et al.*⁶⁰ übernommen (Abb. 1).

Verschiedene Nomenklaturen der 5'-untranslatierten Exons									Referenz	
-	-	-	-	-	-	1'	-	1	62	
C [#]	-	C [#]	-	-	-	B	-	A	65	
C	Ha	Hb	-	-	-	1'	E	1	66	
1E ^{##}	1F	1E ^{##}	-	-	1D	1C	1B	1A	38	
E1	F	E2	T1	T2	D	C	B	A	1	60

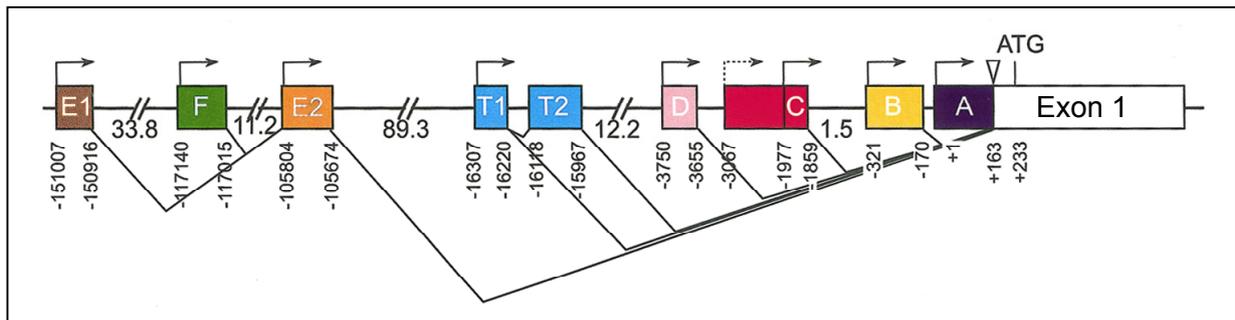


Abbildung 1: Genomische Organisation der humanen ER α -Promotorregion. Im oberen Teil der Abbildung sind die 5'-untranslatierten Exon-Bezeichnungen des humanen ER α -Gens von verschiedenen Forschergruppen in chronologischer Reihenfolge aufgeführt. Das ER α -Gen enthält acht 5'-untranslatierte Exons: B, C, D, T2, T1, E2, F und E1, Bezeichnung in Anlehnung an die Arbeitsgruppe von Gannon^{59, 60, 67}. Abgebildet sind die verschiedenen Promotoren (mit Pfeilen gekennzeichnet) und die zugehörigen 5'-untranslatierten Exons (farbige Boxen). Die jeweiligen Größen der Intronbereiche sind in Kilobasen (kb) angegeben. Die Positionen der verschiedenen Transkriptionsstartpunkte, der *donor splice site* und *acceptor splice site*, relativ zum ursprünglich beschriebenen Transkriptionsstartpunkt (+1), sind unterhalb der farbigen Boxen aufgeführt⁶⁰. Die gemeinsame Spleißstelle (*acceptor splice site*, Position +163) der einzelnen 5'-Exons ist mit einem Dreieck gekennzeichnet. Desweiteren sind die verschiedenen Spleißvarianten schematisch dargestellt. Die Transkription startet am 5'-untranslatierten ersten Exon, mit der Bezeichnung Exon B, C, D, T1, F und E1 und von der stromaufwärts gelegenen Region des Exons 1 (Exon A). Bei Exon A handelt es sich nicht um ein unabhängiges Exon. ^{#, ##} Diese Exons wurden fälschlicherweise als zusammenhängend beschrieben.

Bisher wurden für das humane ER α -Gen (hER α) gewebetypabhängig sieben verschiedene Promotorvarianten (A, B, C, D, E, F und T) beschrieben (Abb. 1), deren Transkripte alle in der 5'-UTR variieren, wohingegen der Translationsstartpunkt (ATG), ebenso wie die *splice site*, konserviert zu sein scheint⁶⁰. Alle 5'-Exons spleißen dabei an eine gemeinsame *acceptor*-Spleißstelle im ersten Exon der Protein-kodierenden Region des Östrogenrezeptors. Etwas

komplexer sind die Spleißvorgänge bei den Promotoren T, F, E und deren assoziierten 5'-Exons. Beim Promotor F spleißt zunächst Exon F zu Exon E2 bevor beide Exons an die gemeinsame Spleißstelle im kodierenden Exon 1 spleißen (Abb.1). Demzufolge ist die resultierende 5' nicht-kodierende Sequenz ein Produkt aus drei nicht-kodierenden Exons, der 5'-Sequenz von Exon F und einer mittleren Sequenz von Exon E2 und der 3'-Sequenz stromabwärts der gemeinsamen Spleißstelle von Exon 1.

Die meisten dieser hER α -Transkripte generieren das 66 kDa große ER α -Protein (ER α 66). In einigen Fällen kommt es jedoch durch alternatives Spleißen der 5'-Exons zu einem Verlust des ersten kodierenden Exons, was zu einer im N-Terminus verkürzten hER α -Isoform mit einem Molekulargewicht von nur 46 kDa führt. Das verkürzte Protein wurde in Brustkrebszellen^{38, 68}, Osteoblasten^{69, 70} und Endothelzellen⁷¹⁻⁷³ nachgewiesen. Das verkürzte Transkript der 46 kDa-Isoform kann durch die hER α -Promotorvarianten E und F generiert werden⁶⁸ oder durch eine alternative Translation ausgehend vom *downstream* ATG (+174) im zweiten Exon⁷⁴. ER α 46 ist biologisch aktiv und moduliert die Gewebeantwort auf einen E2-Stimulus durch die Bildung von Homodimeren und Heterodimeren mit ER α 66. In transienten Transfektionsexperimenten bewirkte ER α 46 die Inhibierung der ER α 66-vermittelten Transaktivierung⁷⁵.

Obwohl die ER α -cDNA von vielen Spezies bekannt ist, wurde bislang nur die genomische Struktur von ER α in Huhn, Maus, Ratte und Regenbogenforelle intensiv untersucht⁶⁰. Bisher sind sechs *upstream*-Exons (A, B, C, F1, F2 und H) bei der Maus⁷⁶ und vier *upstream*-Exons (0 oder B, 0S, 0N und C) bei der Ratte beschrieben⁷⁷⁻⁷⁹. Die Promotoren der Maus und die Exons A und B entsprechen den Exons A und B beim Menschen. Die Sequenzhomologie der Exons beträgt jeweils ca. 60%. In der Ratte sind die Promotoren A und B nicht vorhanden^{60, 79}. Die größte Homologie besteht zwischen dem Exon C von Mensch und Maus und dem Exon 0/B der Ratte. Sie beträgt knapp 90%. Auch die Sequenz des humanen Exons F, des Exons F1 der Maus und eines Bereiches von Exon 0S der Ratte sind zu ungefähr 70% homolog. Die Exons H der Maus und C der Ratte sind zu 95% homolog und werden speziell in der Leber transkribiert. Ein entsprechendes Pendant wurde beim Menschen bisher nicht gefunden. Das ER α -Gen wird beim Huhn von fünf verschiedenen Promotoren mit der Bezeichnung A1, A2, B, C und D transkribiert^{80, 81}. Die Exons A1 und B sind mit den Exons A und B des humanen ER α -Gens zu ca. 50% homolog. In der Regenbogenforelle wird das ER α -Gen von zwei verschiedenen Promotoren (1 und 2a) transkribiert⁸², für die es keinerlei Entsprechung beim Menschen gibt.

1.3.4 Gewebe- und zellspezifische Aktivität von ER α

Die Initiation der Transkription des ER α -Gens kann durch die sieben verschiedenen Promotoren (A, B, C, D, E, F und T) erfolgen. Die Promotoraktivität ist dabei gewebe- und zellspezifisch. So sind zum Beispiel in MCF-7-Zellen, einer humanen Brustkrebszelllinie, alle Promotoren bis auf die Promotorvariante T, die bisher nur in Testis und Epididymis beschrieben wurde⁵⁹, aktiv^{38, 68}. Mit einem Anteil von 50 % stellt die mRNA-Variante A den größten Anteil dar und ist in Brustkrebszellen weitaus häufiger anzutreffen als in normalem Brustgewebe. Dies spricht für eine erhöhte Aktivität der Promotorvariante A bei Brustkrebs. Denger *et al.* konnten hingegen zeigen, dass die Transkription des ER α -Gens im Knochen ausschließlich durch die Aktivität des F-Promotors erfolgt⁷⁵. Desweiteren wurde gezeigt, dass im Endometrium A und C, in Ovarien C und F und in der Leber E die dominanten Promotorvarianten sind³⁸. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Promotorvarianten A, B und C vorwiegend in Zellen und Geweben aktiv sind, die relativ große Mengen an ER α exprimieren. Im Gegensatz dazu sind in Zellen und Geweben mit einer geringen ER α -Expression, z. B. Leber und primären Osteoblasten, die mehr distal gelegenen Promotoren E bzw. F aktiv⁶⁷.

1.3.5 Regulation der ER α -mRNA-Transkription durch *cis*- und *trans-acting* Elemente

Im Gegensatz zu den bereits zahlreich beschriebenen humanen ER α -Promotorvarianten und deren unterschiedliche Aktivitäten in verschiedenen Zellen und Geweben sind bisher nur vergleichsweise wenige *cis*- und *trans-acting* Elemente des hER α -Gens identifiziert worden. Dabei sind diese Elemente maßgeblich für die Regulation der Transkription des ER α -Gens verantwortlich.

Der erste Promotor, der für das ER α -Gen identifiziert wurde, war die Promotorvariante A. Sie ist hauptsächlich in Zellen aktiv, die relativ große ER α -Transkriptmengen exprimieren. Einige wenige der *cis*- und *trans-acting* Elemente, die an der Regulation der ER α -Expression beteiligt sind, konnten mittlerweile identifiziert werden. So konnten Schuur *et al.* zeigen, dass der Transkriptionsfaktor AP2 γ innerhalb des untranslatierten Bereiches stromaufwärts vom ersten Exon bindet und die Transkription des ER α -Gens in hormonabhängigen Tumoren aktiviert⁸³. Dabei führt die Bindung von AP2 γ zu einer veränderten Chromatinstruktur innerhalb des ER α -Promotors.

ERF-1 (*estrogen receptor factor 1*), ein Mitglied der AP2-Transkriptionsfaktor-Familie, bindet innerhalb der 5'-untranslatierten Region des ER α -Gens und spielt so eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation des Promotors A in ER-positiven T47-D-Zellen^{84, 85}.

Tang *et al.* untersuchten indes einen etwa 4 kb langen DNA-Abschnitt des humanen ER α -Promotors in verschiedenen Brustkrebszelllinien. Mit Hilfe funktioneller Promotoranalysen konnte ein *Enhancer*-Element zwischen -3778 bp und -3744 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert werden. Dieser *Enhancer* wurde als ER-EH0 bezeichnet und besteht aus einer AP-1 Bindungsstelle, die c-Fos und c-Jun bindet, und einer benachbarten *cis*-aktiven Sequenz, die wiederum einen oder mehrere weitere, bisher unbekannte Faktoren rekrutiert ⁸⁶. Die signifikante Erhöhung der Promotoraktivität durch dieses *Enhancer*-Element beschränkt sich allerdings auf ER-positive Brustkrebszellen.

Ein Beispiel für einen Transkriptionsfaktor, der selektiv zur promotorspezifischen ER α -Expression in Brustkrebszelllinien beiträgt, ist ERBF-1, dessen *Enhancer*-Element bei -1900 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt lokalisiert ist ⁸⁷. Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Transkriptionsfaktor eine transkriptionsaktivierende Wirkung auf ein distales Promotorelement hat (Promotor C in der Nomenklatur von Kos *et al.* ⁶⁰). ERBF-1 erhöhte dabei nur die Aktivität des C-Promotors. Die Promotoraktivität ist in Brustkrebszelllinien wie z. B. ZR-75, die kein ERBF-1 exprimieren, sehr gering, und folglich werden auch keine signifikanten Mengen an C-hER α -Transkript synthetisiert. In MCF-7-Zellen führte beim Promotor B die durch Akt-Kinase vermittelte negative Regulation des Transkriptionsfaktors FOXO3a zur Herunterregulation der ER α -Expression ⁸⁸.

Eine weitere Möglichkeit, die Genexpression auf Transkriptionsebene zu regulieren, wird durch epigenetische Mechanismen erreicht. So führen Methylierungen bzw. Demethylierungen der DNA und Veränderungen der Chromatinstruktur durch Acetylierung bzw. Deacetylierung von Histonen innerhalb der Promotorregion zu einer veränderten Transkriptionsrate des entsprechenden Gens. Die Herunterregulation der ER α -Genexpression durch Methylierungsvorgänge konnte bereits in unterschiedlichen Geweben wie z. B. Darm, Lunge, Herz, Prostata, Ovarien und außerdem im Blut nachgewiesen werden ⁸⁹⁻⁹⁵. Verschiedene Studien belegen zudem, dass *gene silencing* nicht alleine durch Methylierungen verursacht wird, sondern einhergeht mit dem Entfernen von Acetylgruppen an Lysinresten der Histone H3 und H4 ⁹⁶.

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des humanen ER α -Gens wurden fast ausschließlich an Tumoren bzw. Krebszelllinien vorgenommen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die experimentellen Untersuchungen auch auf andere Zellen und Zelllinien auszuweiten, um ein breiteres und tieferes Verständnis von den Regulationsmechanismen des ER α -Gens zu bekommen.

1.3.6 Einfluss von E2 auf die ER α -Expression

Die beiden ER-Isoformen α und β haben nicht nur eine wichtige Bedeutung für den Mechanismus der E2-vermittelten Wirkung, sie sind darüber hinaus selber Gene, deren Expression durch E2 reguliert werden kann. Dieser Form der rückgekoppelten Regulation kommt bei der östrogenabhängigen Regulation der Expression aller nachgeschalteten Gene eine übergeordnete Bedeutung zu. Verschiedene Studien zeigten, dass E2 in der Lage ist, die Expression von ER α zell- und gewebetypabhängig zu beeinflussen³⁸⁻⁴³. Während E2 in MCF-7-Zellen zu einer Verringerung der ER α -Expression führt, bewirkt es in anderen Zelllinien wie z. B. FEM-19, ZR-75, T47-D und in der Leber eine erhöhte ER α -mRNA-Expression.

Die Transkription von ER α wird im Knochen vom F-Promotor reguliert. Dies ist der einzige Promotor, der zur Expression von ER α -mRNA in humanen primären Osteoblasten führt. Die transiente Transfektion von Osteosarkomazellen mit einem etwa 1 kb langen Bereich des hER α -F-Promotors und die Kotransfektion mit hER α 66 führte in Abhängigkeit von E2 zu einer 50-fachen Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle⁷⁵. ER α ist damit in der Lage, in einem bestimmten zellulären Kontext seine eigene Expression durch autoregulatorische Mechanismen zu steuern. Ein ähnlicher Mechanismus von Autoregulation wurde von Castles *et al.* für den Promotor C beschrieben⁹⁷.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung und die funktionelle Analyse der 5'-flankierenden Region des humanen kardialen ER α -Gens. Dabei sollten Transkriptionsfaktoren (*trans-acting elements*) und deren putative Bindungsstellen (*cis-acting elements*) identifiziert werden, die bei der Regulation des humanen ER α -Gens eine Rolle spielen. Hierzu sollten zunächst die möglichen Promotorvarianten des ER α -Gens im humanen Myokard identifiziert werden. Anschließend wurde die ermittelte dominante ER α -Promotorvariante hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung für die ER α -Expression eingehender untersucht. Für die dazu erforderlichen *in vitro*-Promotorstudien wurde erstmalig ein Zellkultursystem für eine neue humane linksventrikuläre Kardiomyozyten-Zelllinie (AC16) etabliert, mit dessen Hilfe auch die Wirkung des natürlichen Liganden 17 β -Östradiol (E2) und hER α auf die Transkriptionsaktivität der identifizierten ER α -Promotoren untersucht werden sollte. Darüber hinaus sollte in diesem System die *in vitro* Aktivität des identifizierten Transkriptionsfaktors und dessen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des hER α -Gens analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden sind die Bezugsquellen der wesentlichen Materialien, die zur Durchführung der verwendeten Methoden notwendig waren, aufgelistet.

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), BIOZOL Diagnostica GmbH (Eching) und Fluka (Buchs) verwendet.

2.1.2 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x Elektrophoresepuffer für Western Blot (pH 8,3)	15,1 g Tris-Base 94 g Glycin zu 900 ml mit H ₂ O <i>bide</i> st. lösen 50 ml 10 % SDS zugeben, pH 8,3 einstellen H ₂ O <i>bide</i> st. <i>ad</i> 1000 ml
4x Transferpuffer	138,38 g Glycin 29,09 g Tris-Base H ₂ O <i>bide</i> st. <i>ad</i> 2000 ml
1x Transferpuffer (5 l)	1000 ml 4x Transferpuffer 1000 ml Methanol H ₂ O <i>bide</i> st. <i>ad</i> 5000 ml
Glycin- <i>Stripping</i> -Puffer (pH 2,0)	1,876 g Glycin 100 ml 10 % SDS H ₂ O <i>bide</i> st. <i>ad</i> 1000 ml
10x TBS (pH 7,6)	48,4 g Tris-Base 160 g NaCl zu 1600 ml mit H ₂ O <i>bide</i> st. lösen, pH einstellen H ₂ O <i>bide</i> st. <i>ad</i> 2000 ml
1x TBS-T (0,1% Tween)	100 ml 10x TBS-T 1 ml Tween20 H ₂ O <i>bide</i> st. <i>ad</i> 1000 ml
Blockierungspuffer	5 % (w/v) fettfreies Magermilchpulver 1x TBS-T
10x TBE-Puffer (pH 8,3)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

2.1.3 Bakterienmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; pH 7,2 (100 µg/ml Ampicillin)
LB-Festmedium	LB-Medium; 15 g/l Agar; 100 µg/ml Ampicillin
SOC-Medium	20 g/l Bacto Pepton; 5 g/l Bacto Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glukose; pH 7,0

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Firma
<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i> (DMEM); DMEM/F12 (1:1) mit Phenolrot, mit L-Glutamin ohne Hepes	Invitrogen™
DMEM/F12 (1:1) ohne Phenolrot, mit L-Glutamin ohne Hepes	Invitrogen™
DMEM mit Phenolrot (High Glucose; 4,5 g/ml)	PAA Laboratories GmbH
<i>Foetal Bovine Serum</i> (FBS)	PAA Laboratories GmbH
<i>Charcoal stripped</i> (c.s.) FBS	Biochrom AG
Amphotericin B (Fungizone)	Invitrogen™
HEPES (1 M)	PAA Laboratories GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin/Glutamin; 100x (10.000 Units/ml; 10 mg/ml; 29,2 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH
Trypsin/EDTA mit Phenolrot, 0,25 % Trypsin/1 mM EDTA	GIBCO

Zellen	Medien	Zusammensetzung
AC16	Vollmedium mit Phenolrot (VM)	DMEM/F12 (1:1) mit Phenolrot 12,5 % (v/v) FBS, 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml Amphotericin B 0,25 µg/ml
AC16	Vollmedium ohne Phenolrot (VM ohne PR)	DMEM/F12 (1:1) ohne Phenolrot 12,5 % (v/v) c.s. FBS Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml Amphotericin B 0,25 µg/ml
AC16	Hungermedium ohne Phenolrot (HM ohne PR)	DMEM/F12 (1:1) ohne Phenolrot 2,5 % (v/v) c.s. FBS Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml Amphotericin B 0,25 µg/ml
MCF-7	DMEM Vollmedium mit Phenolrot	DMEM Vollmedium mit Phenolrot (High Glucose; 4,5 g/ml) 10 % (v/v) FBS 1 % HEPES 1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin/Glutamin
	Einfrriermedium	Vollmedium (VM) + 5 % (v/v) DMSO

2.1.5 Kits

Bezeichnung	Anwendung	Firma
QIAprep Spin Miniprep Kit	DNA-Isolierung	Qiagen
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	DNA-Isolierung	Qiagen
QIAamp® DNA Blood Kit	DNA-Isolierung aus Vollblut	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	DNA-Extraktion	Qiagen
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Transfektion	Roche
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Zielgerichtete Mutagenese	Stratagene
ECL™ WB Detection Reagents	Detektion von Proteinen	Amersham Bioscience
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Reporter-Assay	Promega
pCR®4-TOPO® TA Cloning Kit (mit One Shot® TOP 10 chemically competent <i>E. Coli</i>)	Ligation und Transformation	Invitrogen
Invisorb Spin Tissue Mini Kit	DNA-Isolierung	Invitex
DNA-binding Protein Purification Kit	Aufreinigung von DNA-bindenden Proteinen	Roche
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems
BCA Protein Assay	quantitative Proteinbestimmung	Pierce

2.1.6 Enzyme

Name	Funktion	Firma
<i>XhoI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>MluI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
T4-Polynukleotid-Kinase	Endmarkierung von Nucleinsäuren	Promega
T4-DNA-Ligase	Verknüpfen von DNA-Strängen	Invitrogen
Superscript II Reverse Transkriptase	cDNA-Synthese	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	DNA-Synthese	Invitrogen
Platinum® Pfx DNA-Polymerase	DNA-Synthese	Invitrogen
<i>GenTherm</i> DNA-Polymerase	DNA-Synthese	Rapidozym
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	DNA-Synthese	Finnzymes

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen. Die durch Gelfiltration gereinigten Oligonukleotide für die PCR und die zielgerichtete Mutagenese wurden auf eine Konzentration von 50 pmol/μl verdünnt. Die HPLC-gereinigten Oligonukleotide für die EMSA-Experimente und die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide der *self-primed* PCR wurden auf 100 pmol/μl und 50 pmol/μl verdünnt.

Die für die Konstruktion der Primer benötigten Gensequenzen wurden von der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) bezogen. Die Spezifität der Primer wurde durch einen BLAST-Search unter der gleichen

Internetadresse überprüft. Die Primer für die zielgerichtete Mutagenese wurden mit Hilfe des QuikChange® Primer Design Program der Firma Stratagene entworfen. Mittels vorheriger Datenbankanalyse wurde darauf geachtet, dass bei der mutierten Sequenz die putative Bindungsstelle des gesuchten Transkriptionsfaktors wegfällt und kein zusätzlicher potentieller Transkriptionsfaktor bindet. Die Sequenzen aller Primer sind im Anhang (Kap. 8) aufgelistet.

2.1.8 Primäre Antikörper

Name	Nummer	Monoklonal/ polyklonal	Verdünnungen für Western Blot (in Blockierungspuffer)	Firma
NF- κ B p65 (A)	sc-109 X	Kaninchen polyklonal	1:500	Santa Cruz
NF- κ B p50 (H-119)	sc-7178 X	Kaninchen polyklonal	1:500	Santa Cruz
CDP (C-20)	sc-6327 X	Ziege polyklonal	-	Santa Cruz
Prohibitin, Ab-1 (Clone II-14-10)	MS-261-P1AB X	Maus monoklonal	-	NeoMarkers
TFIID (TBP) N-12	sc-204	Kaninchen polyklonal	1:100	Santa Cruz
Anti-ER α	ab2746	Maus monoklonal	-	Abcam

2.1.9 Sekundäre Antikörper

Name	Nummer	Verdünnung (in Blockierungspuffer)	gegen primären Antikörper	Firma
Esel anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	711-035-152	1:7.000	TFIID (TBP)	Dianova
		1:10.000	NF- κ B p50 (H-119)	
		1:10.000	NF- κ B p65 (A)	
Ziege anti-Maus, Cy3-gekoppelt	115-166-003	-	der Maus	Dianova
Ziege anti-Kaninchen, FITC-gekoppelt	111-095-045	-	des Kaninchens	Dianova

2.1.10 Plasmide und Konstrukte

Name	Größe	Referenz
pGL2-basic	5598 bp	Promega
phRL-TK (Renilla-Plasmid)	4045 bp	Promega
pGFP-C1	4,7 kb	Clontech
pSG5-hER α 66 (HEGO)	5895 bp	Dr. P. Chambon
pSG5	4,1 kb	Stratagene
pCR [®] 2.1	3,9 kb	Invitrogen
pCR [®] 4-TOPO [®]	3956 bp	Invitrogen
pGL2-Promotor	5790 bp	Promega
pGL3-Control	5256 bp	Promega
pS2/pGL3	6,1 kb	Prof. Dr. G. Schönfelder

2.1.11 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10 (chemisch-kompetent)	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(<i>ara</i>, <i>leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ- <i>rpsL</i>(StrR) <i>nupG</i></i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue (chemisch-kompetent)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^q Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene

2.1.12 Zelllinien

Zelllinie	Typ	Referenz
AC16	humane linksventrikuläre Kardiomyozytenzellen	⁹⁸
MCF-7	humane Mammakarzinomzellen	Cell Lines Service (CLS)

2.1.13 Patientengut zur Gewinnung von Gesamt-RNA

Die in dieser Arbeit verwendeten linksventrikulären Myokardproben aus menschlichen Herzen stammten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und von nicht verwendeten Spenderherzen mit normaler systolischer Pumpfunktion (Kontrollgruppe). Die Myokardproben wurden bei Herztransplantationen am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) gewonnen und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dr. R. Hetzer zur Verfügung gestellt. Von allen Patienten wurde vor Beginn der Studie eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Aufklärung erfolgte sowohl schriftlich als auch mündlich. Die Studie wurde im Rahmen eines vom Ethikkomitee der Universitätsklinik Rudolf-Virchow genehmigten Protokolls durchgeführt und entspricht der Deklaration von Helsinki.

2.1.14 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Sterile Zellkulturschalen; $\varnothing = 100 \text{ mm}/60,1 \text{ cm}^2$, steril	TPP
6-well-Zellkulturplatten; $\varnothing = 3,5 \text{ cm}$	TPP
8-Kammer-Objekträger	BD Bioscience
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	TPP
Falcon-Polypropylen-Röhrchen	BD Bioscience
96-well-Platten	Greiner Bio-One GmbH
Lysis Matrix D (#9613-100)	Qbiogene
Lysis Matrix (#6540-424)	Qbiogene
illustra™ Micro Spin™ G-25 Columns	GE Healthcare Life Science

2.1.15 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aktivitätsmessgerät	1450 LSC & Luminescence Counter MicroBeta TriLux	Perkin Elmer
Autoklav	Systec V-150	Systec
Belichtungsgerät	Image Eraser	Molecular Dynamics
Brutschrank	Heracell 150	Heraeus
Brutschrank	GFL 3033	GFL
ELISA-Messgerät	Benchmark Plus™ microplate spectrophotometer	Biorad
Fast Prep™ Gerät	FP 120-230	Thermo Savant
Fluoreszenzmikroskop	CTRMIC, DMIRE2	Leica
Freezing Container	Nalgene™ Cryo1°C Freezing Container	Nalgene® Labware
Geltrockner	GIBCO BRL Slab Gel Dryer, GD 40/50	Life Technologies™
Laser-Scan-Mikroskop	Leica TCS-SPE	Leica
Multilabel Counter	1420 Multilabel Counter VICTOR ³ ™	Perkin Elmer
RNA-Messgerät	Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc.
Scanner	STORM 860	Molecular Dynamics
Sequenz-Cycler	Gene Amp PCR Systems 9600	Perkin Elmer
Sequenzierer	ABI Prism TM 310	Perkin Elmer
Sterilbank	Holten Lamin Air; S2010 1.2 EN GG 10 N	Holten
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Tischautoklav	Systec 2540 EL	Systec
Tischzentrifuge	Mikro 22 R	Hettich
Tischzentrifuge	Mikro 20	Hettich
UV-VIS-Spektrophotometer	Genesys 6	Thermo Spectronic
Zentrifuge	Heraeus Sepatech Varifuge 3.0 R	Heraeus
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus

2.1.16 Software

Software	Firma
2100 expert, Version: B.02.05.SI360	Agilent Technologies, Inc.
Adobe® Acrobat® 7.0 Professional (V 7.0.8)	Adobe®
AlphaEase V5.5	Alpha Innotech
BCA-Microplate Manager	Bio-Rad
Chromas 1.4	Griffith University
Endnote 9.0	Thomson
INTAS-Software für Gel Imager	INTAS
NEBcutter V2.0	New England Biolabs Inc.
Office 2000 (Word, Excel, Power Point)	Microsoft®
Photoshop 7.0	Adobe®
SigmaPlot Version 8.0	SPSS Inc.
SPSS for Windows 11.0	SPSS Inc.
STORM 4.0	Molecular Dynamics
Vector NTI® Advance 10	Invitrogen™
Wallac 1450 MicroBeta Windows Workstation 4.0	Perkin Elmer

2.1.17 Statistik

Alle Messwerte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Erstellung der Graphiken sowie der Statistik wurde kommerziell erhältliche Software (SigmaPlot, SPSS) verwendet. Bei dem Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung aus humanem Myokardgewebe des linken Ventrikels

Zur RNA-Isolierung aus humanem Myokardgewebe des linken Ventrikels wurden jeweils ca. 50 mg Biopsiematerial eingesetzt. Zugeschnitten und abgewogen wurde das Material auf einer zuvor mit RNase Zap behandelten, RNase-freien Arbeitsfläche auf Trockeneis. Jeder weitere Arbeitsschritt wurde auf Eis und in der Kühlzentrifuge durchgeführt. Der Zellaufschluss bzw. das Homogenisieren erfolgte mit Hilfe von Lysis Matrix Kugeln der Firma Qbiogene (Hälfte von Lysis Matrix D Kugeln, #9613-100 und eine Kugel Lysis Matrix, #6540-424) und 600 μ l RNAzol B (Tell-Test) in einem Fast Prep™ Gerät (FP 120-230) der Firma Thermo Savant (Stufe 4.0, 20 sec, 2x). Im Anschluss wurden weitere 400 μ l RNAzol B zugegeben, und es wurde 5 min auf Eis inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden wie unter Kap. 2.2.2 durchgeführt.

2.2.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur RNA-Gewinnung aus Zellen wurde in jede Zellkulturschale ($\varnothing = 100$ mm) 1 ml RNAzol B gegeben, und die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Überführen des Lysats in ein 2 ml-Eppendorfgefäß wurden pro 1 ml Lysat 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurde 2 min gevortext, 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4°C und 17.500 xg (Mikro 22 R) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde mit Hilfe von 1 Vol Isopropanol \ddot{u} N bei -20°C gefällt und nach 30minütiger Zentrifugation mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend je nach Größe in 25-50 μ l DEPC-behandeltem H₂O *bidest.* aufgenommen.

2.2.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription kann mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die cDNA-Synthese erfolgte durch das Enzym Superscript II Reverse

Transkriptase (Invitrogen), das unter anderem die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aufweist. Eventuell vorhandene RNasen wurden durch Zugabe eines RNase-Inhibitors (RNaseOut™, Invitrogen) inaktiviert. Pro Ansatz wurden 500 ng RNA mit DEPC-behandeltem H₂O *bideest.* auf 10 µl aufgefüllt und 2 µl (300 ng/µl) Random-Hexamere zugegeben. Es wurde 10 min bei 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu lösen, und bis zur Zugabe des Mastermixes auf Eis inkubiert. Der Mastermix enthielt pro Reaktion 4 µl Reaktionspuffer (5x), 1 µl RNase Out (2 U/µl), 1 µl dNTP (0,5 mM), 2 µl DTT (10 mM) und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase. Zu jedem Ansatz wurden 9 µl Mastermix gegeben, es wurde kurz zentrifugiert, anschließend 10 min bei RT und dann eine Stunde bei 42°C inkubiert. Die Enzymaktivität wurde durch 5minütige Inkubation bei 95°C gestoppt. Für anschließende PCR-Analysen wurde die cDNA mit 79 µl DEPC-behandeltem H₂O *bideest.* auf 5 ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Isolierung genomischer DNA aus Zellen und aus humanen Blutproben

Die Isolierung genomischer DNA aus Zellen erfolgte mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit der Firma Invitek nach Angaben des Herstellers. Zur Gewinnung humaner genomischer DNA wurde Vollblut von gesunden Freiwilligen (n= 3) abgenommen und die genomische DNA mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Kits nach Herstellerangaben isoliert (Qiagen). Im Anschluss wurde die isolierte DNA der drei Spender gepoolt und zur Klonierung der 5'-flankierenden Region des ER α -Gens verwendet.

2.2.5 Qualitative und quantitative Nukleinsäurebestimmung

Konzentration und Reinheit der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Zur qualitativen Überprüfung und quantitativen Abschätzung von Plasmid-DNA wurden 0,8-2,0 %ige Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Beide Methoden wurden nach Standardprotokollen durchgeführt⁹⁹. Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit und dem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer laut Herstellerangaben (Agilent Technologies, Inc.) bestimmt.

2.2.6 Ligation, Transformation von *E. coli* und Plasmid-DNA-Isolierung

Die Ligation von DNA-Fragmenten in die Zwischenvektoren pCR®2.1 bzw. pCR®4-TOPO® (Invitrogen) und pGL2-basic (Promega) erfolgte laut Herstellerangaben. Um die durch Ligation gewonnenen Plasmide in *E. coli* zu transformieren, wurden chemisch kompetente *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen) verwendet. Die Transformation wurde nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Mit den auf Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Agar-Platten gewachsenen

Klonen wurden je 5 ml LB-Medium angeimpft und üN bei 37°C kultiviert (GFL 3033). Die Bakterienkulturen wurden entweder als Vorkultur für eine Maxi-Präparation (Maxiprep) verwendet oder um daraus direkt Plasmid-DNA zu isolieren (Miniprep). Die Mini- und Maxipreps wurden mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits bzw. des Qiagen® Plasmid Maxi Kits nach Herstellerangaben (Qiagen) durchgeführt.

2.2.7 Herstellung von Glycerinkulturen

Von den transformierten *E. coli*-Zellen wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurde 50 %iges Glycerin im Verhältnis 1:1 mit der jeweiligen Bakterienkultur gemischt. Die Glycerinkulturen wurden kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.8 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Spaltung von DNA-Molekülen wurde mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Dazu wurde nach Herstellerangaben verfahren, und es wurden die mitgelieferten Puffer verwendet. In 20 µl-Ansätzen wurde 1 U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt, inkubiert wurde je nach Enzym 2 h, 4 h oder üN bei 37°C. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in Agarose-Gelen in TBE-Puffer.

2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Anreicherung großer Mengen spezifischer DNA-Fragmente aus einer kleinen Menge eines komplexen Gemisches. Die DNA wird durch Erhitzen in die Einzelstränge zerlegt und mit Hilfe von Primern, Desoxyribonukleotiden und einer DNA-Polymerase enzymatisch kopiert. Die so erhaltene DNA wird in sich wiederholenden Reaktionszyklen erneut als Matrize für eine DNA-Synthese eingesetzt.

2.2.10 5'-RACE

Um die 5'-UTRs des humanen ER α -Gens und die daraus resultierenden unterschiedlichen Promotorvarianten zu identifizieren, wurde der GeneRacer™ Kit (Invitrogen) verwendet. Die Methode basiert auf einer RNA-Ligase-vermittelten Amplifikation von cDNA-Enden (RLM-RACE). Dabei wird in mehreren aufeinander folgenden Schritten ein RNA-Oligo selektiv an das 5'-Ende, von dem zuvor die Cap-Struktur mittels Pyrophosphatase entfernt wurde, mit Hilfe einer T4-RNA-Ligase ligiert. Dazu wurde zunächst die RNA von fünf humanen Herzbiopsien des linken Ventrikels (Alter 37-65 Jahre, Median 60) isoliert, wie unter Kap. 2.2.1 beschrieben. Pro Reaktionsansatz wurden 4 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die einzelnen

Arbeitsschritte, die Dephosphorylierung, das Entfernen der mRNA-Cap-Struktur und die anschließende Ligation des RNA-Oligos an die mRNA, wurden nach Herstellerangaben (Invitrogen) durchgeführt. Für die folgende Reverse Transkription wurden 1 µl (4 pmol) des genspezifischen Reverse-Primers (siehe Anhang) und 1 µl des dNTP-Mixes (je 10 mM) zum RNA-Ligationsansatz (10 µl) zugegeben, 5 min bei 65°C und danach 2 min auf Eis inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde ein Reaktionsansatz von 4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOut™ (40 U/µl) und 1 µl Superscript™ II RT (200 U/µl) pipettiert. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert, 50 min bei 42°C inkubiert, und die Reaktion wurde bei 70°C für 15 min gestoppt. Dem Reaktionsansatz wurde nach zweiminütiger Inkubation auf Eis und kurzer Zentrifugation 1 µl RNase H (2 U) zugegeben. Danach wurde der Reaktionsansatz 20 min bei 37°C inkubiert und jeweils 1 µl des Ansatzes für die nachfolgende PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle für die RACE und die reverse Transkription wurde HeLa-Gesamt-RNA (Invitrogen) eingesetzt (HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms).

Für die Untersuchung der fünf cDNA-Proben mittels PCRs wurden folgende Primer verwendet: GeneRacer™ 5' Primer, GeneRacer™ 5' Nested Primer sowie als 3' Primer vier verschiedene genspezifische Primer (GSP): RV1, RV2, RV3 und RV4 (Abb. 2 und siehe Anhang), wobei die ersten drei genspezifischen Primer im kodierenden Exon 1 und RV4 im kodierenden Exon 2 binden (da aus der Literatur bekannt ist, dass Exon 1 rausgespleißt werden kann). Die Amplifikation der cDNA erfolgte durch zwei aufeinander folgende PCRs unter folgenden Bedingungen:

I. Hot Start 5'RACE

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5 min
2	30	95°C	30 s
3		66,3°C	30 s
4		72°C	30 s
5	1	72°C	10 min

Zusammensetzung	Volumen
10x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM/µl)	0,7 µl
dNTPs (1,25 mM/µl)	4 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
GeneRacer™ 5' Primer (10 pmol/µl)	0,7 µl
Jeweils einer der GSP (10 pmol/µl): RV2, RV3 oder RV4	0,7 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Bei der Hot Start PCR wurde die Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) und das MgCl₂ erst nach der initialen Denaturierung zugegeben.

II. Nested PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5 min
2	30	95°C	30 s
3		68,2°C	30 s
4		72°C	30 s
5	1	72°C	10 min

Zusammensetzung	Volumen
10x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM/µl)	0,7 µl
dNTPs (1,25 mM/µl)	4 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
GeneRacer™ 5' Nested Primer (10 pmol/µl)	0,7 µl
Jeweils einer der GSP (10 pmol/µl): RV1, RV2, RV3 oder RV4	0,7 µl
PCR-Produkt der Hot Start PCR	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

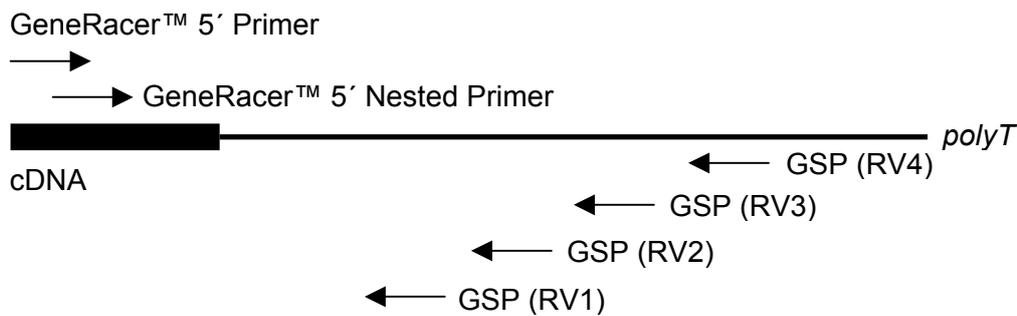


Abbildung 2: Schematische Anordnung der GeneRacer™ 5' Primer und der genspezifischen Primer (GSP)

Die PCR-Fragmente, die mit den ermittelten Werten aus der Literatur bzw. Datenbank übereinstimmten, wurden in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert und in *E. coli* transformiert (TOPO TA Cloning[®] Kit, Invitrogen). Zahlreiche Klone wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, und es wurde die Plasmid-DNA isoliert (QiAprep-Kit, Qiagen). Um den Einbau des korrekten DNA-Fragmentes zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* unterzogen. Das Enzym schneidet nicht innerhalb der möglichen 5'-UTR-Varianten A, B, C, D, E und F, aber links und rechts vom PCR-Produkt innerhalb der flankierenden Region des pCR[®]4-TOPO[®]-Vektors. Je nach verwendeter Primerkombination der beiden PCRs und der Promotorvariante sollten die Fragmentlängen zwischen ~100 bp und ~900 bp liegen. Zeigte sich bei der Restriktionsanalyse die erwartete Fragmentlänge, wurde die entsprechende Probe sequenziert.

2.2.11 *Splicing by overlap extension (SOE)*

Mit der rekombinanten PCR können zwei DNA-Fragmente an einer genau definierten Stelle verknüpft werden. Da für diese Methode keine Restriktionsschnittstelle an der Verknüpfungsstelle erforderlich ist, kann sie für jede beliebige Verknüpfung eingesetzt werden. Erreicht wird dies durch eine Folge von drei PCRs. In der ersten PCR wird das erste DNA-Fragment mit Hilfe eines 5'-überhängenden Primers um den Anfang des zweiten Fragmentes verlängert. In der zweiten PCR wird das zweite DNA-Fragment amplifiziert. In der dritten PCR können die Produkte dieser beiden PCR-Reaktionen gegenseitig als Primer dienen. Die Ausbeute wird dabei durch den Zusatz der randständigen Primer erhöht. Die SOE-Methode (Abb. 3) wurde zur Fusion des Promotorbereiches mit der 5'-UTR der Promotorvariante F eingesetzt. Der zuvor beschriebene überlappende (zueinander komplementäre Bereich) der innenliegenden Primer lag dabei innerhalb der 5'-UTR.

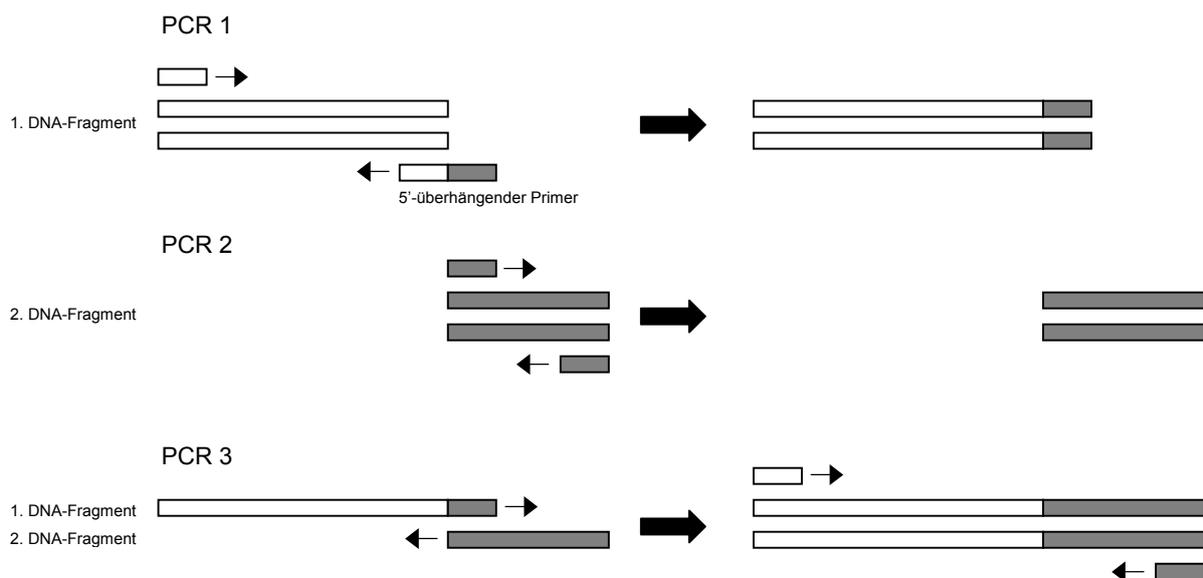


Abbildung 3: Schematische Darstellung des „*Splicing by overlap extension*“ (SOE), Erklärung im Text

Die beiden zu fusionierenden hESR1-F-DNA-Fragmente von -1218 bp bis +83 bp (1311er-Fragment) und von +55 bp bis +359 bp (315er-Fragment) - die Zahlenangaben beziehen sich jeweils auf den Transkriptionsstartpunkt (Abb. 9) - wurden zunächst mittels PCR (PCR1 bzw. PCR2, Bedingungen siehe unten) separat hergestellt, aus dem Agarosegel eluiert (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen) und in den pCR®4-TOPO®-Vektor kloniert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) und mittels Restriktionsverdau mit *EcoRI* und Sequenzierung (Kap. 2.2.8 und Kap. 2.2.17) auf Richtigkeit überprüft. Für den

Promotorbereich und einen Teilbereich der 5'-UTR wurde genomische DNA aus humanem Blut verwendet. Der andere Sequenzbereich der 5'-UTR und ein kurzer Abschnitt des kodierenden Exons 1 wurde aus MCF-7-cDNA synthetisiert. Die anschließende Fusion der beiden DNA-Fragmente erfolgte durch zwei aufeinander folgende PCRs, PCR 3 und PCR 3a. Die Bedingungen der vier PCRs sind unten dargestellt.

PCR 1: Amplifikation des 1311er-Fragmentes (-1218 bp bis +83 bp)

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	2 min
2	35	94°C	15 s
3		61°C	30 s
4		68°C	80 s
5	1	68°C	5 min

Zusammensetzung	Volumen
10x Puffer	2,5 µl
MgSO ₄ (50 mM/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM/µl)	0,75 µl
Platinum [®] Pfx DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,2 µl
hESR1-F-FW-A1 (50 pmol/µl)	0,3 µl
hESR1-F-RV-B1 (50 pmol/µl)	0,3 µl
genomische DNA aus humanem Blut (250 ng/µl)	2 µl
H ₂ O	ad 25 µl

PCR 2: Amplifikation des 315er-Fragmentes (+55 bp bis +359 bp)

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	2 min
2	35	94°C	15 s
3		58°C	30 s
4		68°C	80 s
5	1	68°C	5 min

Zusammensetzung	Volumen
10x Puffer	2,5 µl
MgSO ₄ (50 mM/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM/µl)	0,75 µl
Platinum [®] Pfx DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,2 µl
hESR1-F-FW-C1 (50 pmol/µl)	0,3 µl
hESR1-F-RV-D1 (50 pmol/µl)	0,3 µl
cDNA aus MCF-7 (2,5 ng/µl)	5 µl
H ₂ O	ad 25 µl

PCR 3: Fusion des 1311er-Fragmentes mit dem 315er-Fragment

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	98°C	1 min
2	25	98°C	10 s
3		64,5°C	30 s
4		72°C	30 s
5	1	72°C	5 min

Zusammensetzung	Volumen
5x Phusion™ HF Buffer	10 µl
dNTP`s (10 mM/µl)	1 µl
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
hESR1-F-FW-C1 (50 pmol/µl)	0,5 µl
hESR1-F-RV-B1 (50 pmol/µl)	0,5 µl
1311er-Fragment in pCR® 4-TOPO® (250 ng/µl)	4 µl
315er-Fragment in pCR® 4-TOPO® (250 ng/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl
Nach 5 Zyklen erfolgte die Zugabe der randständigen Primer:	
hESR1-F-FW-A1 (50 pmol/µl)	0,6 µl
hESR1-F-RV-D1 (50 pmol/µl)	0,6 µl

PCR 3a: Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das PCR-Produkt aus PCR 3 erneut amplifiziert

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	98°C	1 min
2	20	98°C	10 s
3		64,5°C	30 s
4		72°C	30 s
5	1	72°C	5 min

Zusammensetzung	Volumen
5x Phusion™ HF Buffer	10 µl
dNTPs (10 mM/µl)	1 µl
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
hESR1-F-FW-A1 (50 pmol/µl)	0,5 µl
hESR1-F-RV-D1 (50 pmol/µl)	0,5 µl
PCR-Produkt von PCR 3	2 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Die Platinum® Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen) und die High-Fidelity Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes) produzieren keine A-Überhänge am 3'-Ende. Für die folgenden Klonierungen wurden diese daher nachträglich synthetisiert, indem dem Reaktionsansatz (nach der letzten PCR) 2 U GeneTherm-Polymerase (Rapidozym) zugefügt wurden und 30 min bei 72°C inkubiert wurde. Das SOE-Produkt (1311er/315er-Fragment) wurde aus dem Agarosegel eluiert (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen), in den pCR® 2.1-Vektor (Invitrogen) ligiert und in chemisch kompetente One Shot® TOP10 transformiert.

2.2.12 Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR diente dazu, die dominante Promotorvariante des humanen ER α -Gens im linken Ventrikel zu identifizieren. Für die semiquantitative PCR wurde die cDNA von 14 Spendern (Alter 20-64 Jahre, Median 55) bzw. 14 DCM-Patienten (Alter 38-65 Jahre, Median 50,5) gepoolt. Die einzelnen 5'-UTR-Varianten A, B, C und F des humanen ER α -Gens wurden mit spezifischen Primern (siehe Anhang) und unterschiedlicher Zyklenanzahl (28, 30, 32, 35, 38 und 40) amplifiziert. Anschließend wurden das erste Auftreten der Amplifikate bestimmt. Jeder 25 µl-Ansatz enthielt 70 ng cDNA, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,75 µl MgCl₂

(50 mM/ μ l), 4 μ l dNTPs (1,25 mM/ μ l), 0,2 μ l *GenTherm* DNA-Polymerase (5 U/ μ l), 2,5 μ l 50 %iges (v/v) Glycerin, jeweils 0,2 μ l Forward- und Reverse-Primer (je 50 pmol/ μ l) und H₂O *ad* 25 μ l. Die Parameter für die Amplifikation sind unten aufgeführt. Die unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen sind in Klammern dargestellt.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5 min
2	variabel (s. o.)	95°C	35 s
3		A (60,7°C), B (57,2°C), C (61,5°C), F (59,4°C)	35 s
4		72°C	35 s
5	1	72°C	5 min

Jeweils 25 μ l eines jeden Reaktionsansatzes wurden auf ein 1 %iges Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.2.5). Der Nachweis von β -Aktin als Referenzgen erfolgte mit jeweils 70 ng cDNA. Abweichend von den oben angegebenen Bedingungen wurde das Glycerin weggelassen und jeweils 0,3 μ l Forward- und Reverse-Primer (je 50 pmol/ μ l, siehe Anhang) zugegeben. Die *Annealing*-Temperatur betrug 53,5°C. Die cDNA (70 ng) aus MCF-7-Zellen diente als Positivkontrolle und wurde jeweils mit einer Anzahl von 35 Zyklen amplifiziert.

2.2.13 Herstellung der Expressionskonstrukte der einzelnen hER α -Promotorvarianten A, B, C und F

Die Herstellung der verschiedenen Reporterkonstrukte der hER α -Promotorvarianten A, B und C erfolgte mit Hilfe der PCR unter Verwendung von humaner genomischer DNA (Kap. 2.2.4). Die amplifizierte Sequenz der Promotorvariante A umfasst dabei einen Bereich von -1019 bp bis +260 bp, die Promotorvariante B von -1303 bp bis -175 bp, und die Promotorvariante C enthält einen Sequenzabschnitt von -3215 bp bis -1859 bp (die Zahlen beziehen sich auf den ursprünglich von Kos *et al.* beschriebenen Transkriptionsstart⁶⁰). Die verwendeten Primer sind im Anhang beschrieben. Jeder 50 μ l Reaktionsansatz enthielt 250 ng genomische DNA, 10 μ l 5x Phusion™ HF Buffer, 1 μ l dNTPs (10 mM/ μ l), 0,5 μ l Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μ l), jeweils 0,5 μ l Forward- und Reverse-Primer (je 50 pmol/ μ l) und H₂O *ad* 50 μ l. Die Parameter für die Amplifikation sind unten aufgeführt.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	98°C	30 s
2	35	98°C	10 s
3		72°C	30 s
4	1	72°C	5 min

Von der hER α -Promotorvariante F wurde eine Serie unterschiedlich langer Expressionskonstrukte hergestellt. Das längste Promotorfragment hESR1-F(-1218/+359; für Sequenz siehe Abb. 9), das als Template für alle weiteren Konstrukte diente, wurde per SOE (*splicing by overlap extension*, Kap. 2.2.11)-Methode hergestellt. Alle weiteren verkürzten Sequenzen der Promotorvariante F (Abb. 10) wurden mittels Standard-PCR und den im Anhang aufgeführten Primern synthetisiert.

Die amplifizierten Promotorvarianten wurden in die Zwischenvektoren pCR[®]2.1 oder pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen) kloniert, mittels Restriktion analysiert und anschließend sequenziert. Die korrekt amplifizierten Promotorbereiche wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* bzw. *MluI* (New England Biolabs) aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und vor das Luciferase-Reportergen in den pGL2-basic Expressionsvektor (Promega) kloniert.

2.2.14 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Zur zielgerichteten Mutagenese spezifischer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in den Reporter-gen-Konstrukten wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Es handelt sich dabei um ein PCR-System, in dem zwei komplementäre Oligonukleotide benutzt werden, die in ihrer Mitte die gewünschte Mutation tragen und von unmodifizierten Nukleotidsequenzen flankiert sind. Mittels dieser Mutagenese-Primer wird eine Amplifikation des zu mutierenden Plasmids durchgeführt. In einem 50 μ l-Ansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA (hESR1-F(-910/-9)-pGL2-basic) mit je 125 ng Mutagenese-Primer (siehe Anhang), 5 μ l Reaktionspuffer (10x), 1 μ l dNTP-Mix und 1 μ l *Pfu*Turbo DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l) gemischt und unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30 s
2	16	95°C	30 s
3		55°C	1 min
4		68°C	6 min 30 s

Im Anschluss an die PCR wurde zu den Ansätzen jeweils 1 μ l des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/ μ l) gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. *DpnI* hydrolysiert dabei ausschließlich die methylierte Plasmid-DNA. Da nur die aus Bakterien gewonnenen nicht-mutierten Ausgangsplasmide, die als Matrize in der PCR dienten, über diese Methylierungen verfügen, nicht aber die aus der PCR hervorgegangenen mutierten Plasmidstränge, kommt es zum selektiven Abbau der nicht-mutierten Ausgangsplasmide. Die Transformation der mutierten Plasmide in 50 μ l XL1-Blue superkompetente Zellen und die anschließende Plasmid-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben (Stratagene) bzw. wie in Kap. 2.2.6 beschrieben. Die DNA-Sequenz wurde mittels Restriktions- (Kap. 2.2.8) und Sequenzanalyse (Kap. 2.2.17) überprüft.

2.2.15 Nachweis der 5'-UTRs der unterschiedlichen Promotorvarianten des humanen ER α -Gens in AC16-Zellen

Für den Nachweis der unterschiedlichen 5'-UTRs der Promotorvarianten A, B, C, und F des humanen ER α -Gens in AC16-Zellen wurde cDNA, die aus RNA aus AC16-Zellen hergestellt wurde, mit Hilfe der PCR analysiert. Die für die einzelnen Promotorvarianten verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet. Ein 25 μ l-Ansatz enthielt 70 ng cDNA, 2,5 μ l Reaktionspuffer (10x), 0,75 μ l MgCl₂ (50 mM/ μ l), 4 μ l dNTPs (1,25 mM/ μ l), 0,2 μ l *GenTherm* DNA-Polymerase (5 U/ μ l), jeweils 0,3 μ l Forward- und Reverse-Primer (je 50 pmol/ μ l) und H₂O ad 25 μ l. Die cDNA wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5 min
2	40	95°C	35 s
3		59,8°C	35 s
4		72°C	35 s
5	1	72°C	5 min

2.2.16 Nachweis des ER α - und ER β -Gens in AC16-Zellen

Der Nachweis erfolgte wie in Kap. 2.2.15 beschrieben. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet. Abweichend von den in Kap. 2.2.15 aufgeführten PCR-Bedingungen wurden jeweils 50 ng cDNA (AC16) und 12,5 ng cDNA (MCF-7, Positivkontrolle) amplifiziert. Die *Annealing*-Temperatur betrug 58,1°C.

2.2.17 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz wurden die klonierten Inserts sequenziert. Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.*¹⁰⁰. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Der Sequenzierungsansatz (10 μ l) enthielt 400 ng DNA, 3 μ l Primer (1 pmol/ μ l), 2 μ l Terminator Ready Reaction Mix und 2 μ l 5x Big Dye Sequencing Buffer. Die PCR wurde im Perkin Elmer Gene Amp 9600 unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96°C	1 min
2	25	96°C	10 s
3		50°C	10 s
4		60°C	4 min

Nach Aufreinigung mittels Sephadex G50[®]-Säulen wurden die Proben im Sequenziergerät (ABI Prism TM 310, Perkin Elmer) aufgetrennt und die Sequenzen abschließend per Hand ausgewertet.

Die Sequenzierungen wurden zu Beginn der Arbeit wie oben beschrieben durchgeführt. Später wurden sie von der Firma SMB Services in Molecular Biology (Sequenzierservice ABI BigDye-Terminator-Chemie) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Computerprogramme Chromas 1.4 (Griffith University) und BLAST (NCBI ¹⁰¹) analysiert.

2.2.18 Zellkultur

Die AC16-Zellen und die MCF-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen ($\varnothing = 100$ mm) in einem Brutschrank der Firma Heraeus (Heracell 150) bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchte von 95 % kultiviert.

2.2.18.1 Kulturbedingungen der AC16-Zellen und MCF-7-Zellen

Die Anzucht der adhärent wachsenden AC16-Zellen und der MCF-7-Zellen erfolgte in zwei unterschiedlichen Vollmedien (VM, Kap. 2.1.4). Die AC16-Zellen wurden beim Erreichen einer Konfluenz von 80-100 % dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:3 und die MCF-7-Zellen im Verhältnis 1:10 passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale erfolgte mit Hilfe von 1 ml Trypsin/EDTA und einer 5minütigen Inkubation bei 37°C. Durch Zugabe von 9 ml VM wurde das Trypsin inaktiviert. Nach Zentrifugation bei 250 xg und 4°C für 10 min (Megafuge 1.0R) wurde das Zellpellet in VM resuspendiert. Für Funktionsansätze wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, oder die Zellen wurden zur Weiterkultivierung erneut in Kulturschalen ausgesät. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage ausgetauscht.

Die MCF-7-Zellen wurden ausschließlich zum Zwecke der RNA-Gewinnung kultiviert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.2.3) und diente u.a. als Positivkontrolle bei verschiedenen PCR-Analysen.

2.2.18.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen bis zum Erreichen einer 100 %igen Konfluenz in Vollmedium (VM, Kap. 2.1.4) kultiviert und anschließend mittels 1 ml Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 9 ml VM inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 250 xg und 4°C 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R). Das Zellpellet wurde in 1 ml kaltem Einfriermedium (VM und 5 % (v/v) DMSO, Kap. 2.1.4) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach 24 h

Lagerung bei -80°C in einem Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene® Labware) wurden die Kulturen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden sie kurz bei 37°C angetaut, in 10 ml VM überführt und bei 250 xg und 4°C 10 min pelletiert (Megafuge 1.0R). Das Pellet wurde in 10 ml frischem VM resuspendiert und die Zellsuspension auf zwei je 10 ml VM enthaltende Zellkulturschalen verteilt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt.

2.2.18.3 Transiente Transfektion von AC16-Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden die AC16-Zellen in 6-well-Zellkulturplatten überführt (150.000 Zellen in 2 ml VM pro well) und üN im Brutschrank inkubiert. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium durch VM ohne Antibiotika und Antimykotikum ersetzt. Ein Transfektionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von insgesamt 100 μl und enthielt den jeweiligen pGL2-Expressionsvektor (1 μg), Renilla-Plasmid (10 ng) und FuGENE® 6 Transfection Reagent (3 μl). Die Ansätze wurden in DMEM/F12 ohne Zusätze angesetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Jeweils 100 μl des Transfektionsansatzes wurden pro well auf die Zellen pipettiert und die Zellen 6 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das Transfektionsmedium entfernt und üN durch VM ersetzt. Als Negativkontrolle diente der leere pGL2-basic-Vektor, ohne Promotor vor dem Luciferase-Gen, und als Positivkontrolle der pGL2-Promotor- bzw. der pGL3-Control-Vektor (jeweils 1 μg /Transfektionsansatz, Promega). Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde das Renilla-Plasmid (phRL-TK) eingesetzt. Um die Grundaktivität der AC16-Zellen bezüglich ihrer Luciferase- und Renilla-Aktivität zu bestimmen, wurde in jedem Transfektionsexperiment ein nichttransfizierter Ansatz mitgeführt. Jeder Transfektionsansatz wurde im Dreifachansatz durchgeführt. Mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays wurde die Expressionsaktivität gemessen (Kap. 2.2.19).

2.2.18.4 Transiente Transfektion von AC16-Zellen mit hESR1-F(-910/-9)-pGL2 und anschließende Behandlung mit Parthenolid

Um die suppressorische Eigenschaft von NF- κB p50 auf die Aktivität des F-Promotors des ER α -Gens zu untersuchen, wurden die AC16-Zellen mit dem Promotorkonstrukt hESR1-F(-910/-9)-pGL2 transient transfiziert und anschließend mit Parthenolid behandelt. Parthenolid inhibiert die Degradation von I $\kappa\text{B}\alpha$ und verhindert dadurch die Aktivierung von NF- κB .

Die transiente Transfektion der AC16-Zellen erfolgte wie in Kap. 2.2.18.3 beschrieben. Pro 100 μl Transfektionsansatz wurden 1 μg des Expressionskonstruktes hESR1-F(-910/-9)-pGL2 und 10 ng des Renilla-Vektors für die eingesetzt. Nach 6 h wurde das Transfektionsmedium entfernt und üN durch VM ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit Parthenolid

(Biomol) behandelt und bei 37°C inkubiert. Dazu wurde das üN-Medium abgesaugt und durch VM mit einer Endkonzentration von 10 µM Parthenolid ersetzt. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der transient transfizierten Zellen mit einer adäquaten DMSO-Menge (Vehikel) behandelt. Es diente als Lösungsmittel für das Parthenolid. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS (2 ml/well) gewaschen und pro well 100 µl DMEM ohne Phenolrot und ohne Zusätze zugegeben, die Zellen mit dem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C üN eingefroren. Die Expressionsaktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays gemessen (Kap. 2.2.19).

2.2.18.5 Untersuchung der Parthenolid-Wirkung auf die Translokation von NF-κB p50 in AC16-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Parthenolid-Wirkung durch die verminderte Verfügbarkeit an NF-κB p50 im Zellkern hervorgerufen wird, sollte mit Hilfe eines immunologischen Nachweises der Einfluss von Parthenolid auf die Translokation von NF-κB p50 vom Zytoplasma in den Nukleus nachgewiesen werden.

Hierfür wurden die AC16-Zellen in Zellkulturschalen in VM kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen mit 10 µM Parthenolid in VM 6 h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der Zellen mit einer adäquaten DMSO-Menge (Vehikel) behandelt. Nach der Inkubation wurde das Medium wieder abgesaugt, und die Zellen wurden einmal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde anschließend sofort wieder abgesaugt und pro Zellkulturschale 1 ml kaltes PBS zugegeben, die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4°C und 150 xg (Mikro 22 R) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Isolierung der nukleären Proteine und der anschließende immunologische Nachweis erfolgten wie in Kap. 2.2.20 und Kap. 2.2.24 beschrieben.

2.2.18.6 Kulturbedingungen der AC16-Zellen für die transiente Kotransfektion und anschließende Behandlung mit E2

Die Anzucht der AC16-Zellen erfolgte in VM ohne Phenolrot (Kap. 2.1.4). Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-well-Zellkulturplatten überführt (150.000 Zellen in 2 ml VM ohne Phenolrot pro well) und üN im Brutschrank inkubiert. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium durch VM ohne PR und ohne Antibiotika und Antimykotikum ersetzt. Ein Transfektionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von insgesamt 100 µl und enthielt den jeweiligen pGL2-Expressionsvektor (1 µg), pSG5-hERα66 (HEGO-Vektor; 100 ng), Renilla-Plasmid (10 ng) und FuGENE® 6 Transfection Reagent (3 µl). Die Ansätze wurden in

DMEM/F12 ohne PR und ohne Zusätze angesetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Jeweils 100 µl des Transfektionsansatzes wurden pro well auf die Zellen pipettiert und die Zellen 6 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das Transfektionsmedium entfernt und üN durch HM ohne PR (Kap. 2.1.4) ersetzt. Für die einzelnen Ansätze wurden die Zellen 48 h entweder mit 10^{-8} M 17β -Östradiol (E2) oder mit 10^{-8} M Dextrin in HM ohne PR im Brutschrank inkubiert. Das Dextrin dient als *coating*-Substanz (Vehikel) für das wasserlösliche E2.

Bei einigen Stimulationsansätzen wurden Kotransfektionen der hER α -Promotorkonstrukte mit dem leeren pSG5-Vektor (100 ng/Transfektionsansatz, Stratagene) ohne die kodierende Sequenz des hER α durchgeführt. Hiermit sollte überprüft werden, ob allein der pSG5-Vektor einen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität gegenüber dem Vehikel hat. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Behandlung mit E2 wurde anstelle der Expressionsvektoren das pS2/pGL3-Plasmid in die AC16-Zellen transfiziert. Bei diesem Reporterkonstrukt sind zwei Östrogen-responsive Elemente (ERE, *estrogen responsive element*) dem Luciferase-Gen vorgeschaltet. Bei Anwesenheit von E2 und ER kommt es zur Bindung des Liganden-induzierten ER an das ERE und somit zur Luciferase-Expression. Die Expressionsaktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays gemessen (Kap. 2.2.19).

2.2.18.7 Bestimmung der Transfektionseffizienz von AC16-Zellen mit einem GFP-kodierenden Plasmid und Nachweis des Proteins durch Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von AC16-Zellen wurde transient das *gfp*-Gen, das für das grün-fluoreszierende Reporterprotein (GFP, *Green Fluorescent Protein*) kodiert, in AC16-Zellen transfiziert. Dazu wurde der Vektor pGFP-C1 (Clontech) verwendet. Die Effizienz der Transfektion errechnet sich aus dem Anteil der GFP-exprimierenden Zellen an der Gesamtzahl der AC16-Zellen.

Die Anzucht und die transiente Transfektion der AC16-Zellen erfolgte wie bereits in Kap. 2.2.18.3 beschrieben. Abweichend von diesem Protokoll wurden 100.000 Zellen und 200.000 Zellen (in 2 ml VM pro well) in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. Anstelle des pGL2-Expressionsvektors und des Renilla-Plasmids enthielt der Transfektionsansatz das GFP-Plasmid (1 µg/µl). Im Anschluss an die üN-Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 %igem Formaldehyd (400 µl/well) 20 min fixiert. Anschließend wurden sie erneut mit PBS gewaschen und für die mikroskopische Analyse mittels Fluoreszenzmikroskop (CTRMIC, DMIRE2, Leica) mit 2 ml PBS pro well überdeckt. Die Bildanalyse erfolgte mit Hilfe der OpenLab-Software. Zur Auswertung wurde der im Mikroskop sichtbare Ausschnitt auf einen Computermonitor übertragen. Ein zufälliger Bereich des Monitors wurde mit einer Schablone, die aus vier gleich großen Kreisen ($\varnothing = 4$ cm) besteht, abgedeckt, und alle grün-fluoreszierenden Zellen und die Gesamtanzahl der Zellen (Durchlicht-Ansicht) innerhalb der vier Bereiche wurden gezählt. Der Vorgang wurde dreimal mit unterschiedlichen Mikroskop-

Ausschnitten wiederholt. Der Quotient aus der Anzahl an grün-fluoreszierenden Zellen und der Gesamtanzahl an Zellen entspricht der Transfektionseffizienz.

2.2.19 Luciferase-Reporter-Assay

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde das Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) verwendet. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl DMEM ohne PR versetzt. Nachfolgend wurden sie mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen üN bei -80°C eingefroren. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei 17.500 xg und 4°C 2 min zentrifugiert (Mikro 22 R). Zur Messung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität wurden 75 µl des Überstandes in ein well einer 96-well-Platte überführt und mit 75 µl des Dual-Glo™ Luciferase-Reagenz versetzt. Im Anschluss wurde die Platte im 1420 Multilabel Counter VICTOR³™ (Perkin Elmer) 10 s geschüttelt, und nach 10minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Lumineszenz für 10 s pro well. Zur Aktivitätsmessung der *Renilla*-Luciferase wurden 75 µl des Dual-Glo™ Stop&Glo® Reagenz pro well zugegeben. Es wurde erneut 10 s geschüttelt, 10 min bei RT inkubiert und 10 s gemessen. Zur Auswertung wurde der Quotient aus *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität gebildet. Da die Transfektionsansätze jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, wurde aus den einzelnen Quotienten der Mittelwert und der Standardfehler (SEM) berechnet und graphisch dargestellt.

2.2.20 Isolierung des nukleären Extraktes aus AC16-Zellen

Die Isolierung des nukleären Extraktes wurde in Anlehnung an ein Protokoll unter „www.celldeath.de/apometh/ems.html“ durchgeführt. Die Anzucht der AC16-Zellen erfolgte in VM im Brutschrank. Die Zellen wurden abtrypsiniert (Trypsin/EDTA), die Reaktion wurde mit 10 ml VM gestoppt, und die Zellen wurden bei 250 xg und 4°C 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Das Zellpellet wurde anschließend mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Saccharose-Puffer (mit NP-40) resuspendiert (100 µl Saccharose-Puffer pro 10 Mio. Zellen). Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 500 xg und 4°C für 5 min (Mikro 22 R). Der Überstand enthält die zytoplasmatische Fraktion, das Pellet die Bestandteile der nukleären Fraktion. Das Pellet wurde mit 1 ml Saccharose Puffer (ohne NP-40) vorsichtig gewaschen und erneut bei 500 xg und 4°C 5 min zentrifugiert (Mikro 22 R). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt, das Pellet in Nidrigsalzpuffer (ca. 30 µl pro 10 Mio. Zellen) resuspendiert und das gleiche Volumen an Hochsalzpuffer in kleinen Volumina schrittweise zugesetzt. Die Proben wurden 45 min bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei

14.000 xg und 4°C für 10 min (Mikro 22 R), wobei der Überstand die nukleäre Proteinfraction enthielt. Im Anschluss wurde die Proteinmenge bestimmt (Kap. 2.2.21), die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Um die isolierten Proteine in der Affinitätschromatographie (Kap. 2.2.31) verwenden zu können, wurden sie in dem dort aufgeführten 1x Protein-Bindungspuffer 1x bei 4°C mittels Slide-A-Lyzer® Mini Dialysis Units dialysiert (3,500 MWCO, Pierce).

Saccharose-Puffer (mit oder ohne NP-40):

0,32 M Saccharose
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
3 mM CaCl₂
2 mM MgOAc
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
0,5 mM PMSF
(0,5 % NP-40, v/v)

Niedrigsalzpuffer:

20 mM HEPES (pH 7,9)
1,5 mM MgCl₂
20 mM KCl
0,2 mM EDTA
25 % Glycerin (v/v)
0,5 mM DTT
0,5 mM PMSF

Hochsalzpuffer:

20 mM HEPES (pH 7,9)
1,5 mM MgCl₂
800 mM KCl
0,2 mM EDTA
25 % Glycerin (v/v)
1 % NP-40 (v/v)
0,5 mM DTT
(für 10 ml 1x *complete Mini* von der Firma Roche)

DTT, PMSF und *complete Mini* wurden jeweils frisch zugesetzt.

2.2.21 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mittels BCA-Proteinmessverfahren auf einer 96-well-Platte mit Flachboden. Pro Reaktionsansatz wurden 20 µl Probe einer 1:5 Verdünnung mit 300 µl Farbstoffgemisch (BCA-Protein-Assay-Reagenzien) versetzt. Die beiden BCA-Protein-Assay-Reagenzien A und B wurden dazu im Verhältnis 50:1 gemischt. Der Niedrigsalzpuffer und der Hochsalzpuffer wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und als Nullwert verwendet. Zusätzlich wurde Rinderserumalbumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen als Proteinstandard mitgeführt. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proteinmessung erfolgte anschließend im ELISA-Platten-Lesegerät bei 550 nm. Der Proteingehalt der Proben lässt sich anhand der Eichgeraden aus den Standardproben ermitteln.

2.2.22 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an Natriumlaurylsulfat (SDS) und Denaturierungsreagenzien entsprechend ihrer Molmasse elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli¹⁰². Hierzu wurde ein Trenngel (6 % bis 12 %) zwischen zwei Glasplatten (10x10 cm) der Bio-Rad Minigel-Apparatur (Bio-Rad Laboratories) gegossen, mit H₂O *bidest.* überschichtet, in feuchte Tücher und Frischhaltefolie eingewickelt und üN bei RT zur vollständigen Polymerisierung stehengelassen. Nach dem Aushärten wurde das H₂O *bidest.* wieder entfernt, das Trenngel mit einer 5 %igen Sammelgel-Lösung überschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels (ca. 30 min) wurde der Kamm herausgezogen, und die Geltaschen wurden mit 1x Elektrophoresepuffer gespült. Bevor die Proteine in die Geltaschen pipettiert wurden, wurden sie mit einem adäquaten Volumen an Protein-Ladepuffer (Roti[®]-Load 1, Carl Roth GmbH & Co. KG) 10 min bei 95°C denaturiert. Als Größenvergleich wurde ein Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C und 100 V für eine Dauer von 120-150 min, je nach Gel-Porosität und Größe der zu erwartenden Proteine. Nach der Auftrennung wurde das Gel entweder mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (Kap. 2.2.23) oder für einen Western Blot verwendet (Kap. 2.2.24).

Trenngel (12 %, 10 cm x 10 cm)	Volumen	Sammelgel (5 %)	Volumen
H ₂ O <i>bidest.</i>	3,3 ml	H ₂ O <i>bidest.</i>	2,1 ml
30 % PAA (w/v)	4 ml	30 % PAA (w/v)	0,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	1 M Tris pH 6,8	300 µl
10 % SDS (w/v)	100 µl	10 % SDS (w/v)	30 µl
10 % APS (w/v)	100 µl	10 % APS (w/v)	30 µl
TEMED	4 µl	TEMED	3 µl

2.2.23 Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Um die Proteine nach der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden die SDS-Gele 1 h oder üN in Coomassie Brilliant Blue R250-Lösung (0,25 % (w/v) Brilliant Blue R-250, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) bei RT inkubiert und anschließend solange mit Entfärbelösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) behandelt, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war.

2.2.24 Western Blot

Um bestimmte Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektieren zu können, wurden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond™-ECL™ Nitrocellulose membrane; Amersham Biosciences)

transferiert. Dazu wurde das Gel 10 min in Transferpuffer (Kap. 2.1.2) äquilibriert und anschließend mit der Nitrocellulose-Membran zwischen Whatman-Papieren und Schwämmen, die zuvor ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert worden waren, „sandwichartig“ angeordnet und in einen mit kaltem Transferpuffer gefüllten Tank überführt. Das Blotting erfolgte bei 4°C und 100 V für 100 min (Minigel: 10x10 cm, Bio-RAD), wobei der Transferpuffer mit Hilfe eines Magnetrührers kontinuierlich durchmischt wurde.

2.2.25 Ponceau-Färbung

Um den Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Western Blot mit Ponceau Rot-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Die Membran wurde dazu 1-3 min in der Färbelösung geschüttelt, anschließend dreimal mit H₂O *bideest.* gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und bis zur Antikörperhybridisierung bei 4°C gelagert.

2.2.26 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulose-Membran in Blockierungspuffer (Kap. 2.1.2) 1 h bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Dadurch soll die unspezifische Adsorption der Antikörper verhindert werden. Die Membran mit dem spezifischen primären Antikörper, der in Blockierungspuffer gelöst war, wurde μ N bei 4°C inkubiert. Das Verdünnungsverhältnis variierte dabei je nach verwendetem Antikörper (Kap. 2.1.8). Die Membran wurde danach dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und 1 h bei RT mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierungspuffer inkubiert. Auch hier war das Verdünnungsverhältnis vom Antikörper abhängig (Kap. 2.1.9). Bevor der Immunkomplex mit Hilfe des ECL-Detektionskits (Amersham Bioscience) nachgewiesen werden konnte, wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen und danach kurz luftgetrocknet. Zur Detektion wurde die proteinbindende Seite mit ECL-Lösung benetzt und 4 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Herstellung der ECL-Lösung erfolgte nach Vorschrift (Amersham Bioscience). Nach der ECL-Behandlung wurde die Membran kurz getrocknet, luftblasenfrei mit Frischhaltefolie bedeckt und mit einem Röntgenfilm (Kodak® BioMax™ light film, Kodak) in eine Filmkassette gelegt. Die Expositionszeit war abhängig von der Signalstärke.

Für eine erneute Antikörperhybridisierung wurden die bereits gebundenen Antikörper durch *Strippen* entfernt. Dazu wurde die Membran im Glycin-*Stripping*-Puffer (Kap. 2.1.2) 30 min bei 50°C leicht geschüttelt und danach dreimal 10 min in TBS-T gewaschen.

2.2.27 Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Inhibition von NF- κ B auf die hER α -Genexpression in AC16-Zellen hat. Für den immunhistochemischen Nachweis von ER α und NF- κ B p50 in diesen Zellen wurden die beiden Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellen wurden auf 8-Kammer-Objekträgern (BD Bioscience) in einer Dichte von 30.000 Zellen pro Kammer ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen 6 h mit 10 μ M Parthenolid oder mit DMSO (Vehikel) behandelt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 3 % Formaldehyd/PBS 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton X-100/PBS 4 min permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 % BSA/PBS blockiert und mit den primären Antikörpern gegen NF- κ B p50 (Kaninchen polyklonal, H-119, Santa Cruz, 1:100 in 0,1 % BSA/PBS) und gegen ER α (Maus monoklonal, ab2746, Abcam, 1:50 in 0,1 % BSA/PBS) 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % BSA/PBS wurden die Zellen mit den sekundären Antikörpern FITC (FITC-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen Antikörper, 1:100 in 0,1 % BSA/PBS, Dianova) und Cy-3 (Cy-3-gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper, 1:100 in 0,1 % BSA/PBS, Dianova) 1 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Hierfür wurden 10 μ l DAPI-Lösung (1:20.000 Verdünnung in PBS einer 2 μ g/ μ l Stammlösung) pro Kammer zugegeben und gleich wieder entfernt. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 0,1 % BSA/PBS gewaschen. Der Objektträger wurde kurz luftgetrocknet, mit Mounting Eindeckmedium (H-1000, Vectashield[®]) versehen und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit Nagellack bedeckt und das Präparat im Dunkeln bei -20°C gelagert. Die Bildanalyse erfolgte mit Hilfe eines Laser-Scan-Mikroskops (Leica TCS-SPE) und die Bildverarbeitung wurde mittels Leica Application Suite AF Software (Version 1.8.0, Leica) durchgeführt. Eine mögliche Kolo-kalisation von hER α und NF- κ B p50 wurde mittels kombinierter Darstellung (Overlay) der in den einzelnen Kanälen (FITC, Cy-3 und DAPI) gemessenen Fluoreszenzemissionen überprüft.

3 % Formaldehyd/PBS

37 % Formaldehyd auf 3 % mit PBS verdünnen

0,1 % BSA/PBS

1 % BSA mit PBS auf 0,1 % verdünnen

0,1 % Triton X-100

100 % Triton X-100 auf 0,1 % mit PBS verdünnen

1 % BSA/PBS

BSA auf 1 % BSA mit PBS verdünnen

DAPI-Lösung (2 μ g/ μ l)

1:20.000 mit PBS verdünnen

2.2.28 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) und Supershift-Assay

Mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) können die Wechselwirkungen von Proteinen mit DNA *in vitro* untersucht werden. Dabei zeigen die Protein-DNA-Komplexe ein anderes Laufverhalten im Gel als DNA-Fragmente allein. Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers, der gegen das an die DNA gebundene Protein gerichtet ist, wird der Komplex vergrößert und die Laufgeschwindigkeit wird nochmals reduziert. Die so entstandene Bandenverschiebung wird als *Supershift* bezeichnet. Die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe erfolgt dabei unter nativen Bedingungen mit Hilfe eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels.

2.2.28.1 Radioaktive Markierung doppelsträngiger Oligonukleotide

Mit dieser Methode wird die 5'-Hydroxy-Gruppe der DNA durch die Übertragung des γ -Phosphatrestes aus [γ - ^{32}P]-ATP (GE Healthcare Life Sciences) markiert. Die Reaktion wird durch das Enzym Polynukleotid-Kinase vermittelt. Die *sense*- und *antisense*-Stränge (siehe Anhang) lagen zunächst einzeln vor und mussten vor dem Markieren renaturiert werden. Dazu wurden je 25 μl der komplementären Oligonukleotide (100 pmol/ μl) kurz auf 95°C erhitzt, langsam auf RT abgekühlt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Endmarkierung des doppelsträngigen Oligonukleotids (hESR1-F-oligo-lang-WT) erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Endmarkierung	Volumen
OligoCpG (1 pmol/ μl)	1 μl
Kinase-Puffer (10x)	2,5 μl
[γ - ^{32}P]dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ = 0,37 MBq/ μl)	2,5 μl
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/ μl)	1,25 μl
H ₂ O <i>bideest.</i>	<i>ad</i> 25 μl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und die Kinase anschließend 10 min bei 65°C inaktiviert. Zur Trennung der markierten DNA von den nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden wurde der Ansatz mit Hilfe einer G-25 Sephadex-Säule (GE Healthcare Life Sciences) aufgereinigt. Dazu wurde die Säule zunächst gevortext, um das Harz zu resuspendieren. Der Schraubdeckel der Säule wurde ein wenig aufgedreht und der Bodenverschluss entfernt, die Säule in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 735 xg trocken zentrifugiert (Mikro 20, Hettich). Die Säule wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt, die *Labeling*-Reaktion auf die Mitte der Säule pipettiert und 2 min bei 735 xg zentrifugiert (Mikro 20, Hettich). Das Eluat enthält die gereinigte DNA und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Aktivität des markierten Oligonukleotids wurde mittels Szintillationszähler (1450 LSC & Luminescence Counter MicroBeta TriLux,

Perkin Elmer) bestimmt (1 ml S-Fluid + 1 µl Eluat) und für den Einsatz im EMSA auf 60.000 cpm/µl mit H₂O *bidest.* verdünnt.

2.2.28.2 EMSA/*Supershift*-Assay

Die Bindungsreaktion erfolgte unter den unten aufgeführten Bedingungen.

Bindungsreaktion	Volumen/Menge	Bindungspuffer (5x)
Nukleärer Extrakt aus AC16-Zellen	5 µg	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
³² P-oligo (60.000 cpm/µl)	1 µl	750 mM KCl
poly [d(IC)] (1 µg/µl)	2 µl	2,5 mM EDTA
Bindungspuffer (5x)	4 µl	0,5 % Triton-X 100 (v/v)
H ₂ O <i>bidest.</i>	<i>ad</i> 20 µl	62,5 % Glycerin (v/v)
		1 mM DTT

Um die Spezifität der Protein-DNA-Wechselwirkung zu überprüfen, wurde dem Ansatz nicht-radioaktiv markiertes Oligonukleotid in 100-fachem (100 pmol) Überschuss zugegeben (Kompetition). Dabei binden die Proteine proportional zum gewählten Verhältnis von unmarkierten und ³²P-markierten Oligonukleotiden. Die gebildeten Komplexe aus Protein und unmarkiertem Oligonukleotid sind aufgrund des nunmehr verdrängten ³²P nicht mehr zu detektieren, und die spezifische Bande (*Shift*) verschwindet. Der spezifische Nachweis der DNA-bindenden Proteine erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper (*Supershift*-Assay), die gegen NF-κB p50 (*nuclear factor kappa B p50*), NF-κB p65 (*nuclear factor kappa B p65*), CDP (*CCAAT displacement protein*) und PHB (Prohibitin) gerichtet waren. Der spezifische Antikörper wurde mit 5 µg nukleärem Proteinextrakt 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz der Bindungsreaktion mit dem darin enthaltenen markierten doppelsträngigen Oligonukleotid zugegeben, und es wurde 1 h bei RT inkubiert. Um auszuschließen, dass es sich bei dem detektierten *Shift* um ungebundenes ³²P-markiertes Oligonukleotid handelt, wurde in jedem EMSA ein Ansatz nur mit ³²P-markiertem Oligonukleotid mitgeführt. Das Acrylamidgel wurde zur vollständigen Polymerisierung zuvor üN bei RT stehengelassen. Vor dem Probenauftrag wurde das Gel in TBE-Puffer (1x) bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA für 30 min laufen gelassen. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 5 %igen SDS-freien Acrylamidgel bei 150 V für ca. 2 h. Das Gel wurde anschließend 1 h bei 70°C auf dem Geltrockner (GIBCO BRL Slab Gel Dryer, GD 40/50, Life Technologies™) vakuumgetrocknet und bis zu einer Woche bei -20°C auf einem Phospho-Imager-Film (BAS-IP MS 2040, Fuji Photo Film CO. LTD.) exponiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Scanners STORM 860 und der Software STORM 4.0 (beides Molecular Dynamics).

Zusammensetzung eines nicht-denaturierenden 5 %igen Polyacrylamidgels (50ml)	
H ₂ O <i>bidest.</i>	41,5 ml
10x TBE-Puffer (pH 8,3)	2,5 ml
PAA, Rotiphorese Gel 40 (19:1)	6 ml
APS (10 %, w/v)	0,25 ml
TEMED	0,05 ml

2.2.29 *Shift-Western*

Die *Shift-Western*-Methode gleicht der EMSA-Methode. Beim *Shift-Western* ist jedoch das Oligonukleotid nicht radioaktiv markiert. Die Proteine des gebildeten Protein-DNA-Komplexes werden nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert.

In dieser Arbeit wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse drei Methoden (EMSA, *Shift-Western* und Coomassie-Färbung) parallel durchgeführt (Schema siehe Abb. 4). Für die EMSA-Methode (Kap. 2.2.28) wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid (³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT) 1 h lang bei RT mit 5 µg nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen inkubiert. Bei der *Shift-Western*-Methode enthielten die Reaktionsansätze nukleären Proteinextrakt aus AC16-Zellen und 1 pmol bzw. 50 pmol nicht-radioaktiv markiertes Oligonukleotid (hESR1-F-oligo-lang-WT). Um die aufgetragene Menge an Proteinen mittels Coomassie-Färbung (Kap. 2.2.23) abschätzen zu können, wurden noch zwei weitere nicht-radioaktive Ansätze mit 1 pmol und 50 pmol Oligonukleotid, die ebenfalls zuvor mit nukleärem Proteinextrakt inkubiert worden waren, auf das Gel aufgetragen. Um das Bandenmuster der drei unterschiedlichen Ansätze von EMSA, *Shift-Western* und Coomassie-Färbung miteinander vergleichen zu können, wurden alle Reaktionsansätze auf ein 5 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Jeweils neben der Spur des eigentlichen Probenauftrags wurden 10 µl eines Proteinmarkers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) aufgetragen.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde beim EMSA die 72 kDa-Bande des Proteinmarkers radioaktiv markiert. Das Gel wurde anschließend in drei Teile zerschnitten und mit Hilfe von drei unterschiedlichen Verfahren analysiert. Das Bandenmuster des EMSA wurde mittels Autoradiographie detektiert. Die nicht-radioaktiven Bereiche des Polyacrylamidgels wurden nach der Elektrophorese im Nass-Blot-Verfahren (Kap. 2.2.24) auf Nitrocellulose 1 h 45 min bei 100 V und 4°C geblottet und die an dem Protein-DNA-Komplex beteiligten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die NF-κB-Untereinheiten p50 (H-119, Santa Cruz) und p65 (A, Santa Cruz) untersucht bzw. mit Coomassie angefärbt.

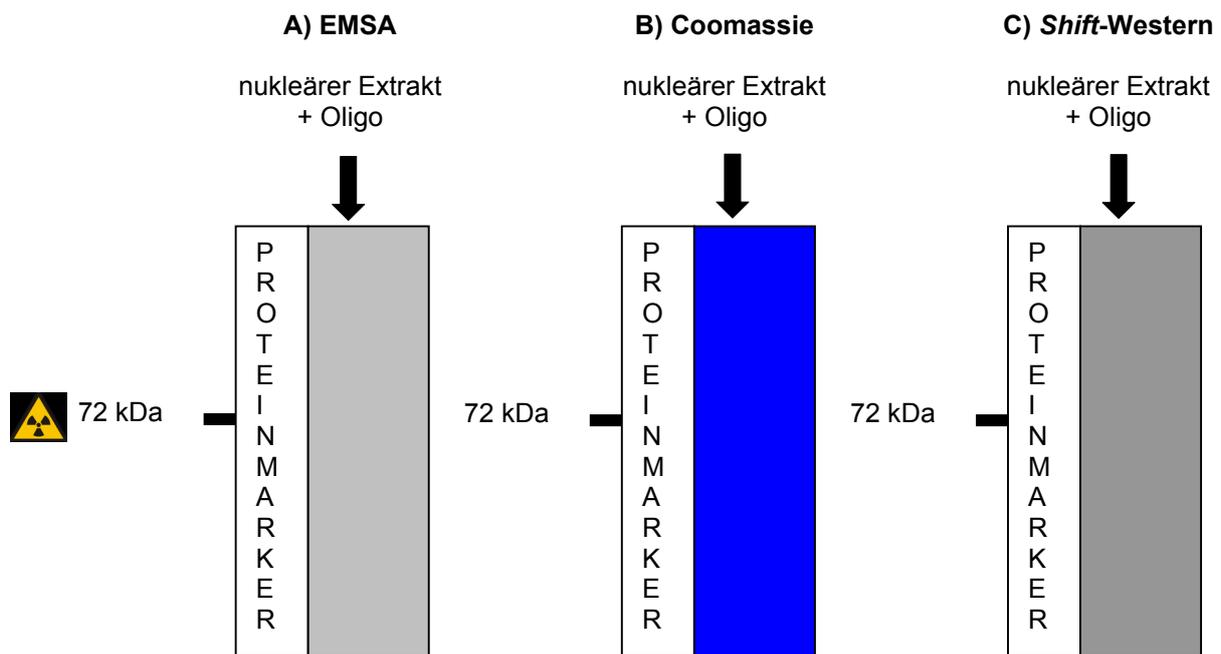


Abbildung 4: Schematische Darstellung von EMSA (A), Coomassie-Färbung (B) und *Shift-Western* (C)

2.2.30 *Self-primed* PCR

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie lassen sich gezielt Proteine isolieren, die spezifisch an DNA-Zielsequenzen binden. Um die Ausbeute dieses nukleären Proteins zu erhöhen, wurde die zu untersuchende DNA-Bindungssequenz mit Hilfe der *self-primed* PCR vervielfältigt. Die *self-primed* PCR wurde mit einem Oligonukleotid durchgeführt, dessen Sequenz aus zwei direkten Sequenzwiederholungen besteht (siehe Anhang). Dadurch entstanden lange Multimere mit mehreren *direct repeats*. Für die notwendige Ligation des hergestellten Multimers an das 16mer-Oligonukleotid der Magnetpartikel bei der anschließenden Affinitätschromatographie (Kap. 2.2.31) mussten die 5'-Enden der Oligonukleotide phosphoryliert sein.

Jeder 100 μ l-Reaktionsansatz enthielt 10 μ l *Pwo* SuperYield PCR Buffer (10x mit Mg^{2+}), 2 μ l dNTP-Mix, 1 μ l *Pwo* SuperYield DNA-Polymerase (5 U/ μ l), 71 μ l H_2O und je 8 pmol 5'-phosphoryliertes Oligonukleotid (FW und RV). Um die optimale Zyklenzahl zu ermitteln, wurden jeweils 20 μ l der Reaktionsansätze nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen entnommen und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Nachfolgend sind die PCR-Bedingungen für die *self-primed* PCR aufgeführt.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	2 min
2	35	95°C	15 s
3		72°C	1 min
4	1	72°C	5 min

2.2.31 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ermöglicht die Aufreinigung von Proteinen, die an eine bekannte DNA-Sequenz binden. Sie erfolgte anhand eines optimierten Protokolls des DNA-binding Protein Purification Kit der Firma Roche. Dieses Kit enthält Magnetkugeln, an deren Oberfläche Streptavidinmoleküle gebunden sind. Ein doppelsträngiges 16mer-Oligonukleotid ist am 3'-Ende mit Biotin markiert. Durch die Biotinylierung kann eine Kopplung mit Streptavidin erfolgen. An das freie Ende des Oligonukleotids kann dann mit Hilfe der T4-DNA-Ligase die gewünschte Protein-bindende DNA-Sequenz in Form eines 5'-phosphorylierten Oligos ligiert werden. Durch Inkubation des Oligo-Magnetpartikel-Komplexes mit nukleärem Proteinextrakt kommt es zur Bindung des Proteins an die spezifische DNA-Sequenz. Das Zustandekommen dieser Bindung wird dabei maßgeblich durch die Affinitätskonstante bestimmt. Unspezifische Proteine mit einer niedrigen Affinitätskonstante binden nicht. Um die Qualität der Aufreinigung zu erhöhen, werden unspezifisch DNA-bindende Proteine durch Zugabe von poly[d(IC)] abgefangen. Die spezifisch DNA-bindenden Proteine werden anschließend mit Hilfe eines Hochsalzpuffers von den immobilisierten Magnetpartikeln eluiert. Der Ansatz der Negativkontrolle bestand aus Magnetkugeln (inklusive 16mer-Oligonukleotid) und nukleärem Proteinextrakt. Die verwendeten Materialien und Lösungen sind unten aufgeführt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Streptavidin-Magnetpartikel mit gebundenem Oligo	1 mg/100 µl
Puffer TEN 2000	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (15-25°C), 1 mM EDTA, 2 M NaCl
Oligo-Ligationspuffer (5x)	262,5 mM Tris-HCl, pH 7,5 (bei 16°C), 52,5 mM DTT, 26,2 mM MgCl ₂ , 0,52 mM ATP
PEG 6000	40 % (w/v) in H ₂ O <i>bidest.</i>
Kaliumchlorid	2,5 M KCl in H ₂ O <i>bidest.</i>
T4-DNA-Ligase	5 U/µl in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 (bei 8°C), 1 mM EDTA, 5 mM DTE, 60 mM KCl, 50 % Glycerol (v/v)
Protein-Bindungspuffer (5x)	100 mM HEPES, pH 7,6, 5 mM EDTA, 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 mM DTT, 1 % Tween 20 (w/v), 150 mM KCl
poly[d(IC)]	1 µg/µl in H ₂ O <i>bidest.</i>
poly-L-Lysin	0,1 µg/µl in H ₂ O <i>bidest.</i>
Elutionspuffer	1 Vol Protein-Bindungspuffer (5x) + 1 Vol KCl (2,5 M)

Zunächst wurden die Streptavidin-Magnetpartikel mit dem gebundenen Oligo äquilibriert. Dazu wurden nach dem Homogenisieren durch Vortexen 50 µl in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß

überführt, die flüssige und die feste Phase durch einen Magnet-Separator voneinander getrennt, und der Überstand wurde verworfen. Die Partikel wurden viermal mit je 50 µl TEN 2000 und dann zweimal mit je 50 µl 1x Ligationspuffer durch Vortexen und anschließendes Separieren gewaschen. Nachdem der Überstand des letzten Waschschrilles verworfen worden war, blieb das Eppendorfggefäß zunächst im Separator, und die Ligationsreaktion wurde angesetzt. Vor Zugabe der T4-DNA-Ligase wurde das Eppendorfggefäß aus dem Separator genommen, kurz gevortext und anschließend auf dem Rotationsschüttler 30 min (kleinste Stufe) bei RT inkubiert.

Ligationsreaktion	Volumen
Oligo-Ligationspuffer (5x)	10 µl
PEG 6000	18,75 µl
KCl (2,5 mM)	4 µl
H ₂ O <i>bideest.</i> ad 47,5 µl	0,75 µl
PCR-Produkt aus der <i>self-primed</i> PCR	14 µl
T4-DNA-Ligase	2,5 µl

Danach wurden die Magnetpartikel mittels Separator von der flüssigen Phase getrennt, und der Überstand wurde verworfen. Die anschließenden Waschschrille (einmal mit 50 µl 1x Oligo-Ligationspuffer, dreimal mit 50 µl 1x Protein-Bindungspuffer, dreimal mit 50 µl Elutionspuffer und dreimal mit 50 µl 1x Protein-Bindungspuffer) erfolgten durch alternierendes Resuspendieren und Separieren. Nachdem der Überstand des letzten Waschschrilles verworfen worden war, blieb das Eppendorfggefäß zunächst im Separator, und die Bindungsreaktion wurde angesetzt.

Bindungsreaktion	Volumen/Menge
Protein-Bindungspuffer (5x)	25 µl
poly[d(IC)]	6,25 µl
poly-L-Lysin	6,25 µl
Nukleärer Proteinextrakt	50 µg
H ₂ O <i>bideest.</i>	ad 125 µl

Das Eppendorfggefäß wurde aus dem Separator entfernt, der Reaktionsansatz gemischt und 30 min (kleinste Stufe) bei RT auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Die Magnetpartikel wurden mittels Separator vom Überstand getrennt, und dieser wurde für weitere Analysen (SDS-PAGE) bei -80°C gelagert. Der Überstand enthält alle nicht-gebundenen Proteine. Anschließend wurden die Magnetpartikel dreimal mit 50 µl 1x Protein-Bindungspuffer gewaschen. Als letzter Schritt folgte die Elution der DNA-bindenden Proteine. Die Magnetpartikel wurden resuspendiert und 10 min bei RT in 15 µl Elutionspuffer inkubiert. Nach dem Separieren wurde das Eluat in ein neues Eppendorfggefäß überführt, und der Elutionsschritt wurde wiederholt. Das Eluat enthält die gereinigten Proteine.

2.2.32 Silberfärbung von Proteinen

Die Silberfärbung ist neben der Coomassie-Färbung ein häufig verwendetes Verfahren zur Visualisierung von Proteinbanden nach einer elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel. Diese Färbemethode ist etwa um das 10- bis 100-fache sensitiver als die Coomassie-Färbung. Nach Fixierung in einer Essigsäure/Ethanol-Lösung wird das Polyacrylamidgel mit Silbernitrat behandelt. Die Ag^+ -Ionen binden an die Proteine und werden dann mit alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, das die Proteine im Gel schwarz färbt. Um die mittels Affinitätschromatographie isolierten Proteine zu detektieren, wurden jeweils 30 μl Eluat mit 10 μl Roti Load I (Roth) versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proben auf ein 5 %iges Sammelgel, gefolgt von einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel (10cm x 10cm, Kap. 2.2.22), aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V für ca. 150 min. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe der Silberfärbungsmethode angefärbt¹⁰³. Hierzu wurde das Silberfärbungskit „Roti®-Black P“ der Firma Roth verwendet. Bis auf zwei Protokollabweichungen wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Abweichungen betrafen die Fixierung der Proteine (sie erfolgte bei 4°C üN ohne Schütteln) und die Silberimprägnierung (ihre Dauer betrug 30 min). Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das Gel in eine Polypropylen-Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

2.2.33 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie werden ionisierte Moleküle durch Magnetfelder beschleunigt, wobei die unterschiedliche Ablenkung der Ionen entsprechend ihren Massen detektiert wird. So lassen sich die Molmassen unbekannter Moleküle bestimmen.

Um bei der Vorbereitung der Proben Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Materialien und Geräte der Reihenfolge nach mit Ethanol (70 %), 0,1 % SDS und H_2O *bidest.* gereinigt. Zur Identifizierung der Proteine wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und anschließend mit massenspektrometrischen Methoden untersucht. Dies wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Joachim Klose (Institut für Humangenetik, Charite Universitätsmedizin Berlin) unter Verwendung von nanoHPLC-ESI-MS/MS (LCQ DECA XP von Thermo) durchgeführt. Die Suche erfolgte in Mascot (<http://www.matrixscience.com>) gegen NCBI nr (taxonomy human; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>, var. Modifikation: Oxidation M). Die identifizierten Proteine wurden in drei Qualitätsklassen (A, B und C) eingeteilt: A = sehr sicher (mindestens drei unabhängige Proteine mit jeweils 95 %iger Sicherheit), B = sicher (mindestens zwei unabhängige Proteine mit jeweils 95 %iger Sicherheit) und C = unsicher (ein Protein mit 95 %iger Sicherheit).

3 Ergebnisse

Die Transkription des ER α -Gens kann an den sieben verschiedenen Promotoren A, B, C, D, E, F und T initiiert werden, wobei deren Transkripte alle in der 5'-UTR variieren. Die einzelnen Promotoren werden dabei gewebe- und zellspezifisch exprimiert. Bisher ist nicht bekannt, welche Promotoren im humanen Myokard aktiv sind und durch welche *cis*- und *trans-acting* Elemente sie beeinflusst werden.

Die Bestimmung der Promotorvarianten des humanen ER α -Gens erfolgte aus isolierter Gesamt-mRNA aus dem linken Ventrikel mit Hilfe der 5'-RACE-Methode, der semiquantitativen PCR und der PCR. Aus den Ergebnissen der 5'-RACE und der semiquantitativen PCR wurde die dominante Promotorvariante im humanen Myokard ermittelt. Um die *cis-acting* und *trans-acting* Elemente innerhalb der dominanten Promotorvariante zu untersuchen, wurden unterschiedlich lange Promotorabschnitte inklusive der 5'-UTR und eines kleinen Bereichs des kodierenden ersten Exons in den Expressionsvektor pGL2-basic vor das Luciferase-Reportergen kloniert. Die hergestellten Expressionskonstrukte wurden in die humane linksventrikuläre Kardiomyozyten-Zelllinie AC16 transient transfiziert und die Promotoraktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays bestimmt.

Die Relevanz der putativen *cis-acting* Elemente wurde durch Mutationsanalysen und die Identität der *trans-acting* Elemente mittels EMSA, *Shift*-Western und Affinitätschromatographie/Massenspektrometrie überprüft. Die funktionelle Bedeutung des identifizierten proinflammatorischen Transkriptionsfaktors konnte durch dessen Inhibition mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors bestätigt werden. Desweiteren konnte die *in vitro*-Aktivität dieses Transkriptionsfaktors und sein Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des hER α -Gens untersucht werden. Darüber hinaus wurde die Reaktivität der im humanen Myokard identifizierten ER α -Promotorvarianten gegenüber E2 mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays untersucht.

3.1 Identifizierung und Charakterisierung der ER α -Promotorvarianten im humanen Myokard

Um herauszufinden, welche unterschiedlichen 5'-UTRs (Kap. 1.3.3) des humanen ER α -Gens im Myokard exprimiert werden, wurde die 5'-RACE-Methode angewendet. Im weiteren Verlauf wurden die einzelnen Myokardproben direkt mit Hilfe der PCR analysiert. Zur Charakterisierung der dominanten humanen kardialen ER α -Promotorvariante wurde eine semiquantitative PCR aus gepoolten Spender-Proben (n = 14, Alter 20-64 Jahre, Median 55), bzw. DCM-Proben (n = 14, Alter 38-65 Jahre, Median 50,5) durchgeführt.

3.1.1 Nachweis der verschiedenen 5'-UTR-Varianten

Für die Detektion der verschiedenen 5'-UTR-Varianten des humanen ER α -Gens in den linksventrikulären Myokardproben wurde die 5'-RACE-Methode mit Hilfe des GeneRacer Kits der Firma Invitrogen durchgeführt (Kap. 2.2.10). Als Ausgangsmaterial diente isolierte Gesamt-RNA aus linksventrikulären Myokardproben von Spenderherzen und von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM). Das Alter der Patienten betrug 37-65 Jahre (Median 60). Da aus den isolierten Herzgeweben zunächst kein spezifisches PCR-Produkt detektiert werden konnte, wurden die PCR-Bedingungen hinsichtlich der Konzentration der Forward- und Reverse-Primer, der Magnesiumchlorid-Konzentration, der eingesetzten cDNA-Menge sowie der *Annealing*-Temperatur optimiert. Die optimalen Ergebnisse bei der Amplifikation der verschiedenen 5'-UTR-Varianten konnten schließlich durch die Hot Start PCR mit anschließender Nested-PCR erzielt werden (Kap. 2.2.10). Die PCR-Fragmente wurden in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert, und anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10). Die Bakterien wurden auf Selektionsmedium kultiviert. Um den Einbau der möglichen 5'-UTR-Varianten A, B, C, D, E und F (inklusive Sequenzabschnitten der kodierenden Exons 1 bzw. 2) zu überprüfen, wurden einzelne Klone zufällig ausgewählt und die daraus isolierte Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten. Die Restriktionsschnittstelle lag dabei außerhalb der *multiple cloning site*. Je nach verwendeter Primerkombination und 5'-UTR-Variante sollten die Fragmentlängen zwischen ~100 bp und ~900 bp liegen (Tab. 1). Die erhaltenen Fragmentlängen wurden mit den ermittelten Werten aus der Datenbank und den Angaben aus der Literatur verglichen und die entsprechenden DNA-Fragmente sequenziert.

Tabelle 1: Erwartete Fragmentlängen unterschiedlicher Promotorvarianten nach 5'-RACE und Restriktionsverdau der Plasmide mit *EcoRI*.

	Promotorvariante	3' Primer; genspezifische Primer und anschließende Restriktion mit <i>EcoRI</i>				Erwartete Fragmentlänge in bp
		RV1	RV2	RV3	RV4	
GeneRacer™ 5' Nested Primer und anschließende Restriktion mit <i>EcoRI</i>	A	198	292	426	728	
	B	185	279	413	715	
	C	153	247	381	683	
	D	131	225	359	661	
	E	257	351	485	787	
	E ohne Exon 1	-	-	-	265	
	F	291	385	519	821	
F ohne Exon 1	-	-	-	299		

Wie in Tab. 2 zu erkennen ist, konnten in den humanen linksventrikulären Myokardproben die 5'-UTR-Varianten B, C und F des ER α -Gens nachgewiesen werden. Von insgesamt 41 positiven Klonen enthielten 85,4 % die F-, 12,2 % die C- und 2,4 % die B-Variante der 5'-UTR. Die Ergebnisse der Klonierungsversuche deuten auf eine Dominanz des F-Promotors im menschlichen Myokard hin.

Tabelle 2: Durch 5'-RACE und Klonierungsexperimente identifizierte 5'-UTRs der Promotorvarianten (in %).

n	Alter	A	B	C	D	E	F
5	37-65 (Median 60)	0	2,4	12,2	0	0	85,4

3.1.2 Direkter PCR-Nachweis der 5'-UTR-Varianten

Die 5'-RACE-Methode diente dazu, stichprobenartig mögliche 5'-UTRs im Myokard zu identifizieren. Da diese Methode sehr zeitintensiv und kostspielig ist, wurden im weiteren Verlauf die einzelnen 5'-UTRs direkt mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Zum Nachweis der einzelnen mRNA-Isoformen wurden spezifische Primer eingesetzt, wobei der Forward-Primer jeweils innerhalb der 5'-UTR und der Reverse-Primer im kodierenden Exon 1 bzw. Exon 2 des hER α -Gens bindet.

Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde zunächst cDNA aus der Brustkrebszelllinie MCF-7 verwendet, die alle zu untersuchenden Varianten A, B, C, D, E und F exprimiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die spezifischen Banden aus dem Gel eluiert und per Sequenzanalyse (Kap. 2.2.17) überprüft.

Mit Hilfe der PCR konnten in 28 linksventrikulären Myokardproben, davon 14 Spenderherzen und 14 Proben von DCM-Patienten, die 5'-UTR-Varianten A, B, C und F nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In keiner der untersuchten Myokardproben konnte ein Nachweis für das Vorhandensein der Promotorvarianten D und E erbracht werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Identifizierung der dominanten Promotorvariante

Die semiquantitative PCR diente dazu, die dominante Promotorvariante des humanen ER α -Gens im linken Ventrikel zu bestimmen, um im weiteren Verlauf die *trans-acting* und *cis-acting* Elemente innerhalb der dominanten Promotorvariante zu analysieren.

Als Ausgangsmaterial diente isolierte Gesamt-RNA aus humanen linksventrikulären Myokardbiopsien (14 Spender und 14 DCM-Patienten, Kap. 2.2.12), die mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Im Anschluss wurde jeweils die cDNA der 14 Spender-Proben sowie der 14 DCM-Proben gepoolt. Die verschiedenen 5'-UTRs der Promotorvarianten A, B, C und F des ER α -Gens wurden mittels semiquantitativer PCR mit

den gepoolten cDNA-Proben als Template und spezifischen Primern (siehe Anhang) mit ansteigender Zyklusanzahl (28, 30, 32, 35, 38 und 40) amplifiziert. Hierbei wurde zyklusabhängig das erste Auftreten des Amplifikates in den zu vergleichenden 5'-UTR-Varianten semiquantitativ bestimmt (Kap. 2.2.12). Wie in Abb. 5 zu erkennen ist, konnte aus gepoolten cDNA-Proben von Spendern das Amplifikat der Promotorvariante F bereits nach 28 Zyklen detektiert werden. Im Vergleich dazu wurde das Amplifikat der Promotorvariante C nach 32 Zyklen und der Promotorvarianten A und B erst nach jeweils 35 Zyklen detektiert. Die gleichen Ergebnisse wurden mit gepoolten cDNA-Proben von DCM-Patienten erzielt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der semiquantitativen PCR und der 5'-RACE (Kap. 3.1.1) deuten darauf hin, dass die Promotorvariante F des ER α -Gens die dominante Form in den humanen linksventrikulären Myokardproben ist.

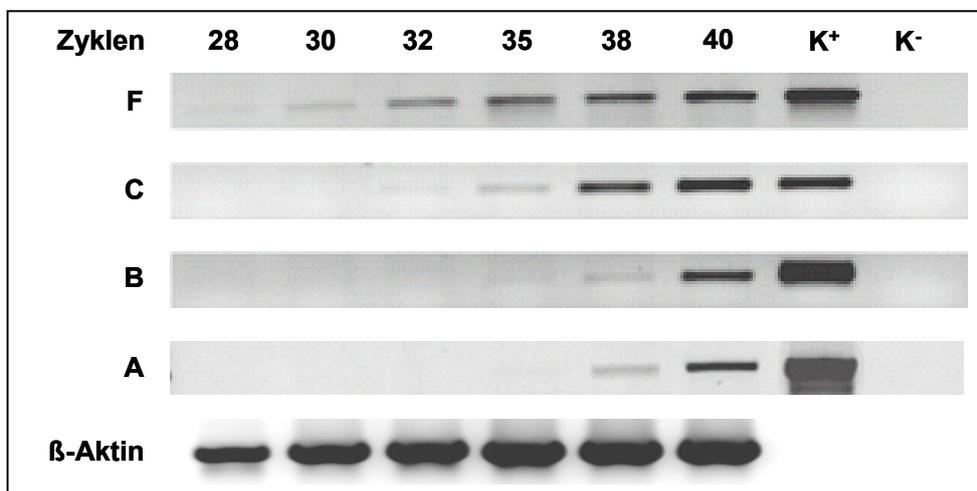


Abbildung 5: Semiquantitative PCR-Analyse verschiedener 5'-UTR-Varianten des humanen kardialen ER α -Gens. Die PCRs wurden mit einem cDNA-Pool aus Spenderherzen durchgeführt. Für die 5'-UTR-Nachweise von A, B, C und F und für den Nachweis des Referenzgens β -Aktin (481 bp) wurden jeweils 70 ng cDNA eingesetzt. Nach einer Zyklusanzahl von 28, 30, 32, 35, 38, 40 wurden die Reaktionen gestoppt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Das F-Amplifikat (320 bp) konnte nach 28 Zyklen, das C-Amplifikat (162 bp) nach 32 Zyklen und die Amplifikate von B (218 bp) und A (591 bp) jeweils nach 35 Zyklen detektiert werden. K⁺: 70 ng cDNA aus MCF-7-Zellen als Positivkontrolle; K⁻: Negativkontrolle.

3.2 AC16-Zellen als *in vitro*-Modell

Für die funktionellen Promotoranalysen wurde zunächst nach einem geeigneten *in vitro*-Modell gesucht. Um die *trans-acting* und *cis-acting* Elemente innerhalb der Promotorvariante F des humanen ER α -Gens zu analysieren, wurden die hergestellten Expressionskonstrukte transient in AC16-Zellen transfiziert. Dabei handelt es sich um die zurzeit einzig bekannte humane linksventrikuläre Kardiomyozyten-Zelllinie⁹⁸. Da bisher aber noch keine Daten bezüglich der Expression beider ER-Isoformen sowie der verschiedenen Promotor-

varianten des ER α -Gens vorliegen, wurden die AC16-Zellen mittels PCR daraufhin untersucht.

3.2.1 Nachweis der Genexpression von ER α und ER β in AC16-Zellen

Zum Nachweis der ER α - und ER β -mRNA-Isoformen wurde Gesamt-RNA aus AC16-Zellen isoliert. Die mittels reverser Transkription synthetisierte cDNA wurde mit Hilfe der PCR und zweier genspezifischer Primerpaare für das ER α - und ER β -Gen analysiert (siehe Anhang). Als Positivkontrolle diente cDNA aus MCF-7-Zellen. Bei ER α führte dies zu einem 138 bp großen Amplifikat (Abb. 6, Spur 2) und bei ER β zu einem 180 bp großen Amplifikat (Spur 4). Beide sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Sowohl das 138 bp große Amplifikat von ER α (Spur 3) als auch das 180 bp große Amplifikat von ER β (Spur 5) konnten in der cDNA aus AC16-Zellen detektiert werden. Obwohl es sich bei der verwendeten Methode nicht um eine quantitative Nachweismethode handelt, ist dennoch deutlich zu erkennen, dass das ER α -Gen in AC16-Zellen (Spur 3) sehr viel schwächer transkribiert wird als in MCF-7-Zellen (Spur 2) und als ER β in AC16-Zellen (Spur 5). Um zu überprüfen, ob es sich bei den mit einem Pfeil markierten Banden tatsächlich um die Transkripte von ER α bzw. ER β handelt, wurden die spezifischen Banden aus dem präparativen Gel ausgeschnitten und anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Analysen ergaben, dass die Gene ER α und ER β in AC16-Zellen transkribiert werden.

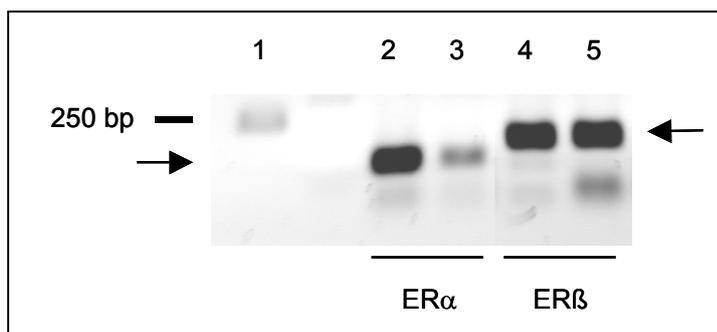


Abbildung 6: Expression der Gene ER α und ER β in AC16-Zellen. Die Spuren 3 und 5 enthalten das PCR-Produkt aus jeweils 50 ng AC16-cDNA. Als Positivkontrollen enthalten die Spuren 2 und 4 das PCR-Produkt aus je 12,5 ng MCF-7-cDNA. Sowohl das 138 bp große Amplifikat von ER α (Spuren 2 und 3) als auch das 180 bp große Amplifikat von ER β (Spuren 4 und 5) konnten in der cDNA von MCF-7 und AC16 detektiert werden. Die Pfeile markieren die spezifischen Banden für ER α und ER β . In Spur 1 wurde als Größenvergleich der DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, MBI Fermentas) aufgetragen.

3.2.2 Identifizierung der 5'-UTR-Varianten von ER α in AC16-Zellen

Es wurde mittels PCR überprüft, ob die bereits im humanen Herzgewebe nachgewiesenen 5'-UTRs der einzelnen Promotorvarianten A, B, C und F auch in der AC16-Zelllinie nachweisbar sind. Wie in Abb. 7 zu erkennen, konnten mit Hilfe von spezifischen Primern (siehe Anhang) die 5'-UTRs zweier Promotorvarianten, nämlich F mit einer Amplifikat-Größe von 320 bp (Spur 1) und C mit einer Amplifikat-Größe von 162 bp (Spur 3), nachgewiesen werden. Die 5'-UTRs der Promotorvarianten A und B konnten nicht nachgewiesen werden (Spuren 2 und 4). Diese Ergebnisse zeigen, dass die in den humanen linksventrikulären Myokardproben gefundenen Promotorvarianten C und F ebenfalls in den AC16-Zellen exprimiert werden. Somit eignen sich die AC16-Zellen als humanes Modellsystem für Untersuchungen regulatorischer Mechanismen auf transkriptioneller Ebene, insbesondere hinsichtlich der ER α -Promotorvarianten C und F.

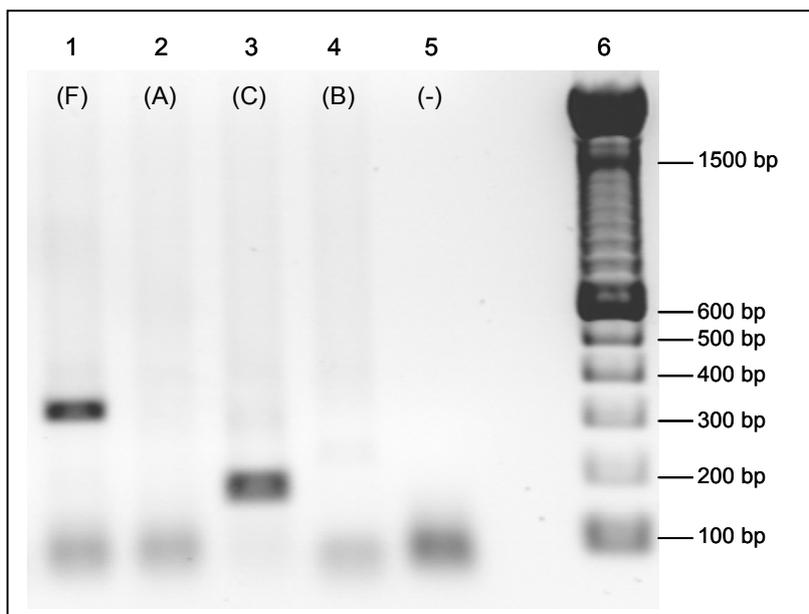


Abbildung 7: PCR-Nachweis der 5'-UTR-Varianten des humanen ER α -Gens in AC16-Zellen. Für den PCR-Nachweis der verschiedenen 5'-UTRs der Promotorvarianten A, B, C und F wurden je 70 ng cDNA aus AC16-Zellen eingesetzt. In Spur 1 konnte das F-Amplifikat mit einer Größe von 320 bp und in Spur 3 das C-Amplifikat mit einer Größe von 162 bp nachgewiesen werden. Die 5'-UTRs der Promotorvarianten A und B wurden nicht nachgewiesen (Spuren 2 und 4). Spur 5 zeigt einen PCR-Ansatz ohne Zugabe von cDNA (Negativkontrolle). In Spur 6 wurde ein 100 bp-DNA-Marker (Invitrogen) als Größenvergleich aufgetragen.

3.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz von AC16-Zellen

Die Transfizierbarkeit von AC16-Zellen wurde bisher noch nicht beschrieben. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurde ein Reportergenkonstrukt (pGFP-C1) transient in die Zellen transfiziert. Das *gfp*-Gen kodiert für ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP, *Green Fluorescent Protein*). Wird das GFP mit blauem Licht oder UV-Licht angeregt, emittiert es hellgrünes Licht. Der im Fluoreszenzmikroskop sichtbare Ausschnitt wurde auf einen Computermonitor übertragen. Die Bestimmung der Gesamtanzahl der Zellen und der grün-fluoreszierenden Zellen erfolgte wie in Kap. 2.2.18.7 bereits beschrieben. Der Quotient aus der Anzahl an grün-fluoreszierenden Zellen und der Gesamtanzahl an Zellen entspricht der Transfektionseffizienz. Die Abb. 8 zeigt exemplarisch ein Bild von transient transfizierten AC16-Zellen in der Durchlicht-Ansicht und denselben Bildausschnitt im angeregten Zustand. Die durchschnittliche Transfektionseffizienz bei 100.000 Zellen/well lag bei 28 % und bei 200.000 ausgesäten Zellen/well bei 33 %.

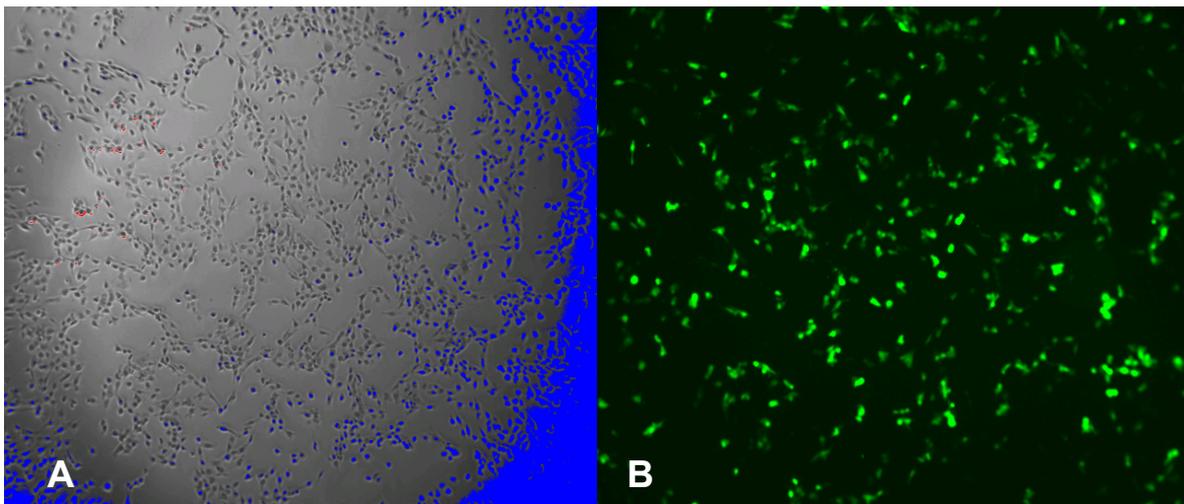


Abbildung 8: Mit dem pGFP-C1-Vektor transient transfizierte AC16-Zellen. Abb. 8A zeigt die mit dem pGFP-C1-Vektor transient transfizierten AC16-Zellen in der Durchlicht-Ansicht. **Abb. 8B** zeigt denselben Bildausschnitt der durch GFP grün-fluoreszierenden Zellen nach Anregung mit blauem Licht.

Da die AC16-Zellen im Vergleich zu anderen Zellen (z. B. HL-1, HT1080) recht groß sind und sie für die geplanten Transfektions- und Stimulationsexperimente mit 17β -Östradiol (E2; Kap. 3.5) zwei Tage länger kultiviert werden müssen, wurden, im Hinblick auf eine optimale Konfluenz, für die weiteren Transfektionsexperimente jeweils 150.000 Zellen/well einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät.

3.3 Funktionelle Analyse des F-Promotors

Die Ergebnisse der vorangegangenen 5'-RACE und der semiquantitativen PCR zeigten, dass die Promotorvariante F des ER α -Gens in den humanen linksventrikulären Myokardproben gegenüber den Varianten A, B und C dominant vertreten ist. Daher wird spekuliert, dass die F-Variante eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation des humanen ER α -Gens spielt. Aus diesem Grund liegt der Fokus dieser Arbeit auf der funktionellen Analyse der Promotorvariante F.

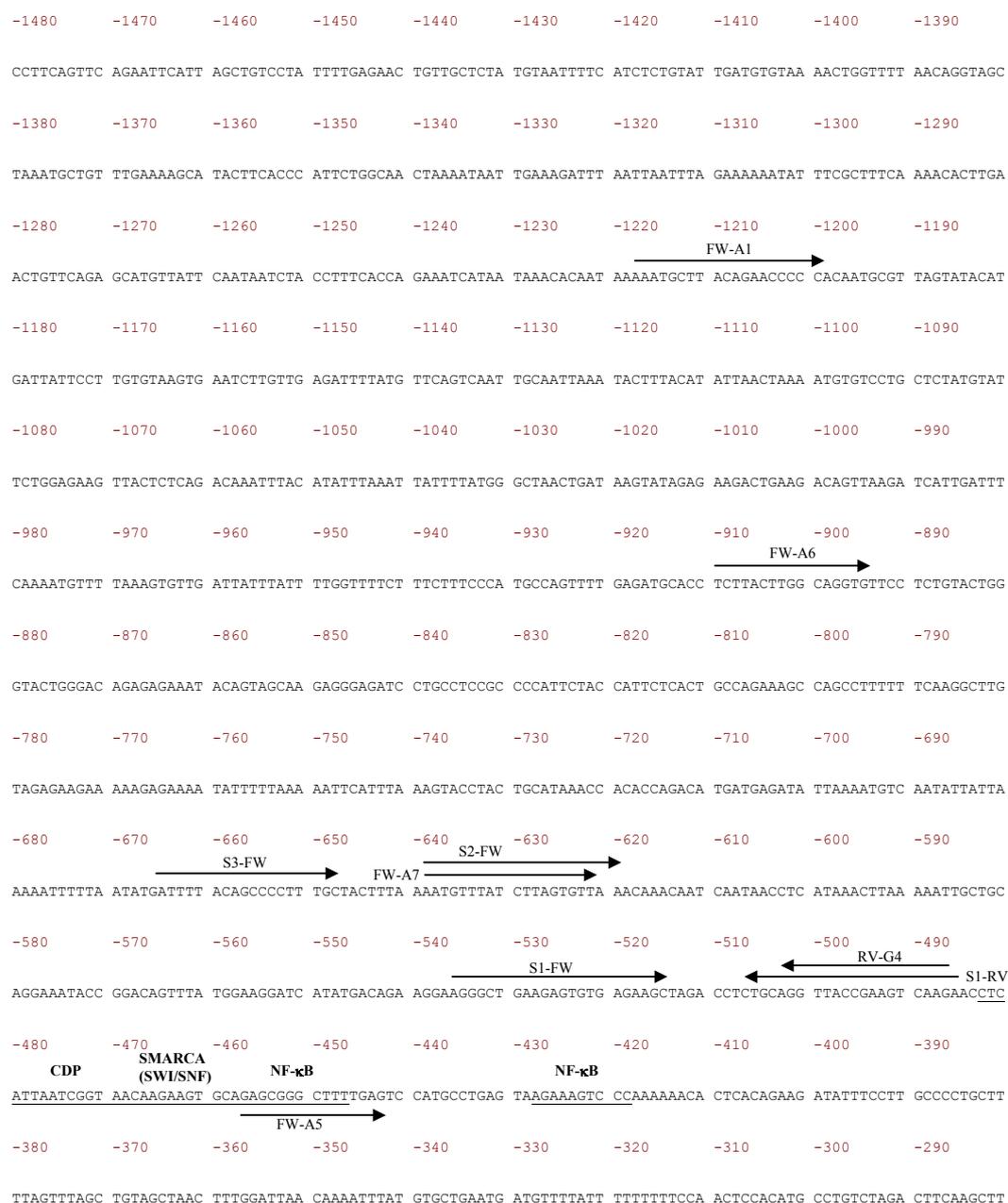
3.3.1 Expressionskonstrukte der hER α -F-Promotorvariante

Um die Transkriptionsfaktoren (*trans-acting elements*) und deren putative Bindungsstellen (*cis-acting elements*) innerhalb der Promotorregion der Promotorvariante F identifizieren zu können, wurde eine Serie von Expressionskonstrukten hergestellt, die unterschiedlich lange Sequenzbereiche der hER α -Promotorvariante F enthalten.

Da, wie bereits erwähnt (Kap. 1.3.3), der Spleißvorgang beim F-Promotor und seinen assoziierten 5'-Exons sehr komplex ist, wurde das längste Promotor-F-Konstrukt hESR1-F-(-1218/+359)-pGL2 (*full length*) in mehreren Schritten amplifiziert. Dazu wurde die F-Promotorsequenz von -118358 bp bis -117140 bp (stromaufwärts des ursprünglich von Kos *et al.* beschriebenen Transkriptionsstartpunktes⁶⁰) zusammen mit der 5'-UTR und einem kleinen Bereich des kodierenden Exons 1 mit Hilfe der SOE-Methode (*splicing by overlap extension*; Kap. 2.2.11) hergestellt. Dafür wurden vorab die beiden zu fusionierenden hESR1-F-DNA-Fragmente von -1218 bp bis +83 bp (1311er-Fragment) und von +55 bp bis +359 bp (315er-Fragment) mit Hilfe der PCR getrennt voneinander amplifiziert. Die Zahlen beziehen sich dabei auf die Position relativ zum Transkriptionsstart (+1, Abb. 9). Als Ausgangsmaterial für die Synthese des Promotorbereiches und eines Teilbereiches der 5'-UTR (-1218 bp bis +83 bp) wurde genomische DNA aus humanem Blut verwendet (Kap. 2.2.4). Der Sequenzbereich der 5'-UTR und ein kurzer Abschnitt des kodierenden Exons 1 (+55 bp bis +359 bp) wurden aus der cDNA einer Brustkrebszelllinie (MCF-7) generiert. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die spezifischen Banden aus dem Gel eluiert. Die DNA-Fragmente wurden in einen Zwischenvektor kloniert. Aus der isolierten Plasmid-DNA wurden die gesuchten DNA-Fragmente mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* und anschließender Sequenzierung überprüft.

Um das *full length*-Fragment des F-Promotors von -1218 bp bis +359 bp zu erhalten, wurden das 1311er- und das 315er-DNA-Fragment in einem Reaktionsansatz mit Hilfe der SOE-PCR amplifiziert (Kap. 2.2.11). Die Amplifikation erfolgte dabei zunächst durch die Zugabe zweier spezifischer interner Primer beider DNA-Fragmente (FW-C1 und RV-B1). Um zu ermöglichen,

dass sich beide DNA-Fragmente nahtlos aneinanderfügen, waren die zwei internen Primer zueinander komplementär. Nach fünf PCR-Zyklen wurden die jeweiligen spezifischen randständigen Primer (FW-A1 und RV-D1) dem Reaktionsansatz zugesetzt, um die Amplifikation des *full length*-Fragmentes (-1218/+359) zu erreichen. Beide randständigen Primer enthielten für die nachfolgenden Klonierungsexperimente in den Luciferase-Reportervektor pGL2-basic jeweils eine spezifische Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen *MluI* bzw. *XhoI*. Eine zweite nachgeschaltete PCR diente dazu, die Amplifikat-Menge zu erhöhen. In Abb. 9 sind die Sequenz des F-Promotors und die Lage und Orientierung der verschiedenen Primer für die Synthese der Deletionskonstrukte abgebildet.



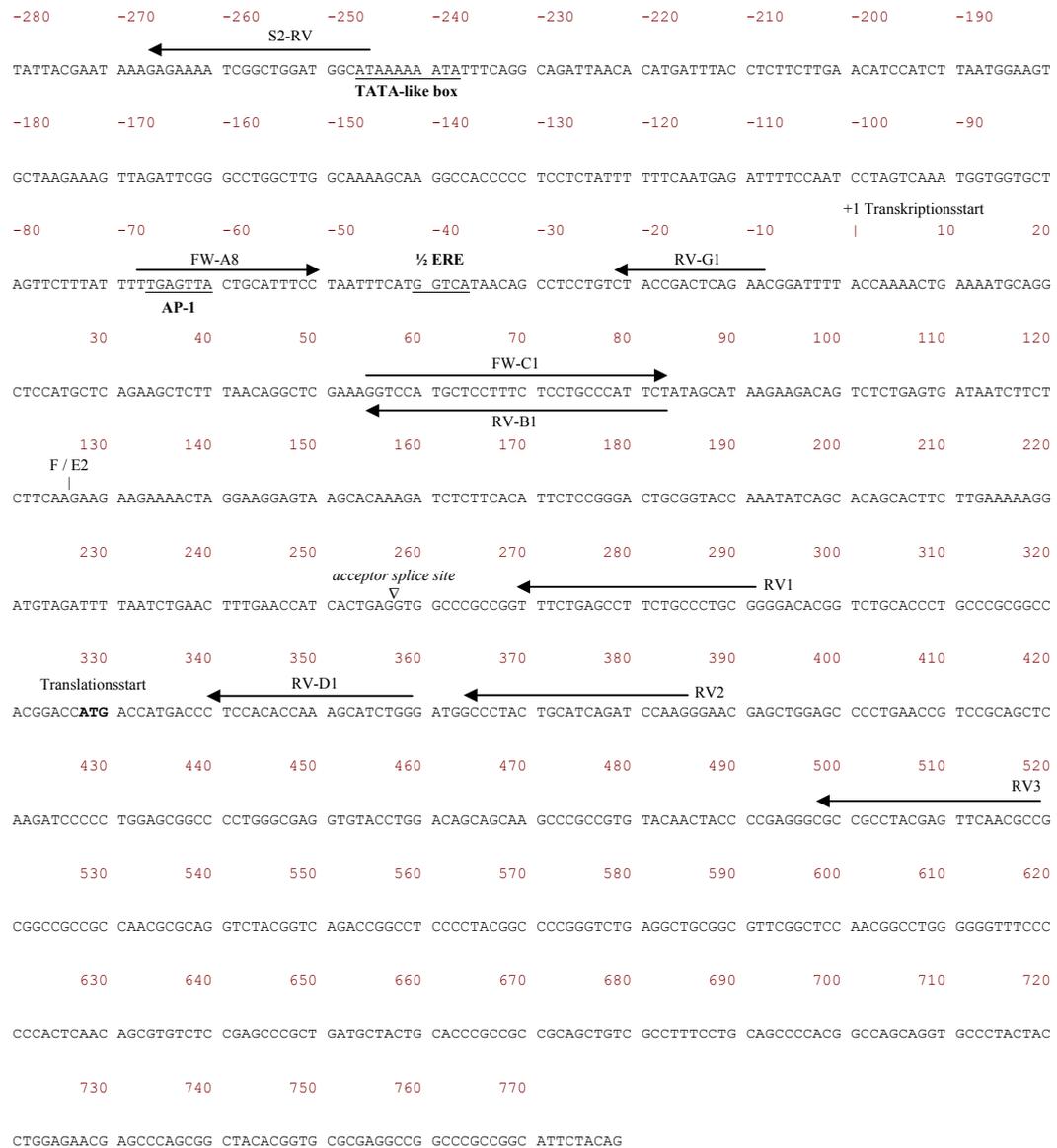


Abbildung 9: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des F-Promotors des humanen ER α -Gens inklusive der 5'-UTR und des kodierenden ersten Exons. Die Exongrenze der 5'-Exons F und E2 ist mit F/E2 angegeben. Die gemeinsame Spleißstelle (*acceptor splice site*) der einzelnen 5'-Exons ist mit einem Dreieck gekennzeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Position relativ zum Transkriptionsstart (+1). Der Translationsstart (ATG) ist fett gedruckt. Die zur Klonierung der einzelnen F-Promotor-Expressionskonstrukte verwendeten Primer und die Sequenzhomologien sind als Pfeile dargestellt. Die zur Sequenzanalyse verwendeten Primer sind mit einem „S“ gekennzeichnet. Die putativen DNA-Bindungsstellen ausgewählter putativer regulatorischer Elemente (Transkriptionsfaktoren) innerhalb des F-Promotors sind unterstrichen.

Das Promotorkonstrukt hESR1-F(-1218/+359)-pGL2 diente als Matrize zur Herstellung verschiedener Deletionskonstrukte. Die zur Klonierung in den pGL2-basic-Vektor verwendeten Primerpaare enthielten ebenfalls am 5'-Ende jeweils eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme *MluI* bzw. *XhoI* (siehe Anhang). In Abb. 10 sind die hergestellten Promotorkonstrukte der hER α -F-Promotorvariante schematisch dargestellt.

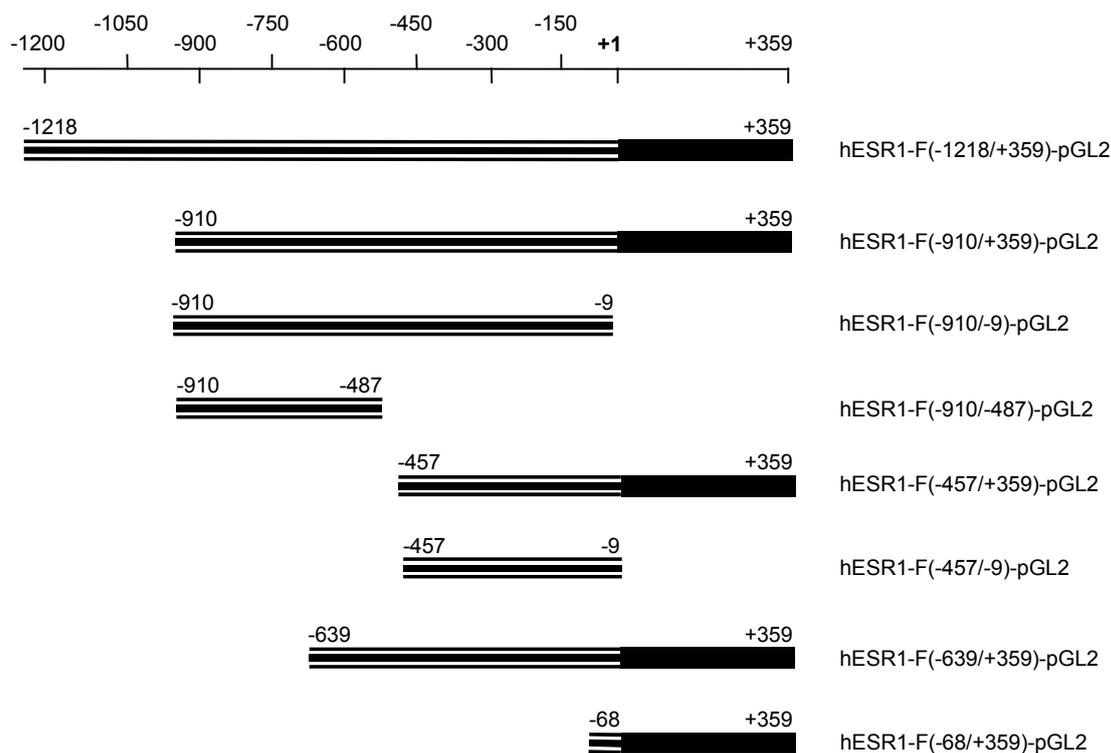


Abbildung 10: Hergestellte Deletionskonstrukte der hER α -F-Promotorvariante in pGL2-basic. Der durchgehend schwarze Balken stellt die 5'-UTR dar, inklusive eines kurzen Sequenzabschnitts des kodierenden Exons 1. Der gemusterte schwarze Balken zeigt den ausgewählten 5'-flankierenden Bereich der hER α -F-Promotorvariante. Die Zahlen beziehen sich auf die Position relativ zum Transkriptionsstart (+1).

3.3.2 Bestimmung der humanen ER α -F-Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporter-Assay

Um die Transkriptionsfaktoren und deren putative Bindungsstellen innerhalb der Promotorregion der Promotorvariante F identifizieren zu können, wurden die AC16-Zellen mit den in Abb. 10 schematisch dargestellten Expressionskonstrukten 6 h transient transfiziert. Nach einer μ N-Inkubation in VM wurden die Zellen geerntet, und die Luciferase-Aktivität der einzelnen Expressionskonstrukte wurde mit Hilfe des Luciferase-Assays gemessen. Für jedes hER α -F-Promotorkonstrukt wurden fünf unabhängige Transfektionsexperimente durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet. Der ermittelte Wert des Ansatzes mit dem leeren pGL2-

basic-Vektor (Negativkontrolle) wurde gleich eins gesetzt, und alle übrigen Werte wurden darauf bezogen.

Wie in Abb. 11 zu sehen ist, zeigt das längste Luciferase-Reporter-Konstrukt hESR1-F-(-1218/+359)-pGL2 eine viermal höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zum leeren pGL2-basic-Vektor, wobei der Anstieg statistisch signifikant ist ($p < 0,01$). Während bei dem Expressionskonstrukt (-910/+359)-pGL2 die Luciferase-Aktivität auf dem Niveau des pGL2-basic-Vektors lag, zeigten die Deletionskonstrukte (-639/+359)-pGL2, (-457/+359)-pGL2 und (-68/+359)-pGL2 eine dreimal, sechsmal bzw. viermal höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zum leeren pGL2-basic-Vektor. Der Anstieg war bei allen drei Konstrukten statistisch signifikant ($p < 0,01$). Wird dem 5'-UTR-freien Promotorkonstrukt (-910/-9)-pGL2, das eine geringe Promotoraktivität aufweist, der proximale Promotorbereich entfernt, so führt dies bei dem daraus resultierenden Konstrukt (-910/-487)-pGL2 zu einer drastischen und signifikanten zwölffachen Erhöhung ($p < 0,01$) der Promotoraktivität im Vergleich zum pGL2-basic-Vektor. Das (-457/-9)-pGL2-Konstrukt, bei dem im Gegenzug der distale Promotorbereich entfernt wurde, zeigt dagegen nur eine etwa vierfach höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zu dem pGL2-basic-Vektor.

Ein Vergleich der unterschiedlichen Luciferase-Aktivitäten lässt vermuten, dass der Sequenzbereich von -910 bp bis -487 bp ein oder mehrere Enhancer-Elemente enthält, deren aktivitätssteigernde Wirkung erheblich abgeschwächt wird, wenn der proximale Promotorbereich von -487 bp bis -9 bp vorhanden ist. Bei den Expressionskonstrukten (-457/-9)-pGL2, (-457/+359)-pGL2 und (-910/-487)-pGL2 sind die Luciferase-Aktivitäten etwa viermal, sechsmal bzw. zwölfmal höher im Vergleich zum pGL2-basic. In allen Fällen sind die Erhöhungen statistisch signifikant ($p < 0,01$). Da bei allen drei Konstrukten der Sequenzbereich von -487 bp bis -457 bp fehlt, wurde spekuliert, dass sich innerhalb dieses Bereiches verschiedene *cis-acting* Elemente befinden, die einen supprimierenden Einfluss auf die Basalaktivität des F-Promotors in AC16-Zellen ausüben.

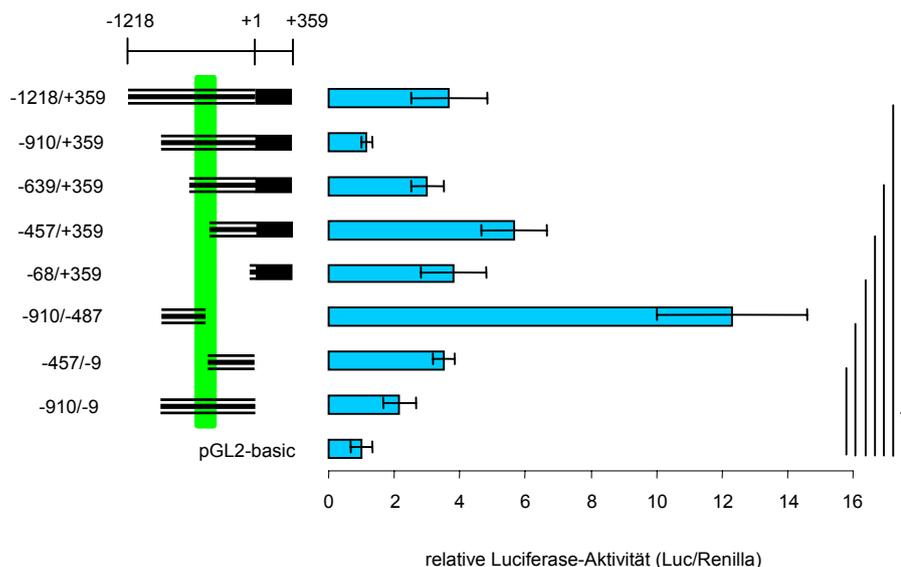


Abbildung 11: Funktionelle Analyse verschiedener hER α -F-Promotorkonstrukte in AC16-Zellen mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays. Dargestellt ist die relative Luciferase-Aktivität verschiedener Deletionskonstrukte der humanen Promotorvariante F des ER α -Gens nach transienter Transfektion in AC16-Zellen. Jeweils 1 μ g des Luciferase-Reporterkonstruktes wurde 6 h in AC16-Zellen transient transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden 10 ng des Renilla-Plasmids kotransfiziert. Danach wurde das Transfektionsmedium entfernt und μ N durch VM ersetzt. Die Luciferase-Aktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays gemessen. Die dargestellten Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchen ($n = 5$) \pm SEM. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Ansatz mit pGL2-basic wurde gleich 1 gesetzt, und alle Werte wurden darauf bezogen. Die Zahlen neben den Fragmenten sind Angaben in bp und stehen für die Position innerhalb der Sequenz relativ zum Transkriptionsstartpunkt (+1). Der grüne Balken markiert den Sequenzbereich um -490 bp bis -440 bp. * $p < 0,01$, bezogen auf den Ansatz mit pGL2-basic.

3.3.3 Analyse putativer Bindungsstellen innerhalb des F-Promotors

Auf der Suche nach putativen regulatorischen Elementen wurde die Sequenz um den Bereich von -490 bp bis -440 bp (relativ zum Transkriptionsstartpunkt) per Datenbankanalyse auf das Vorhandensein möglicher Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen überprüft. Mit Hilfe der Software MatInspector 7.4.3/06 und Alibaba 2.1 konnten im Bereich des in Abb. 11 grün markierten Sequenzabschnittes von ca. -490 bp bis -440 bp putative Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren mit aus der Literatur bekannten negativ-regulatorischen Eigenschaften identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die Transkriptionsfaktoren CDP, SMARCA3 (SWI/SNF) und NF- κ B (Abb. 12). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Funktionalität dieser putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen eingehender untersucht.

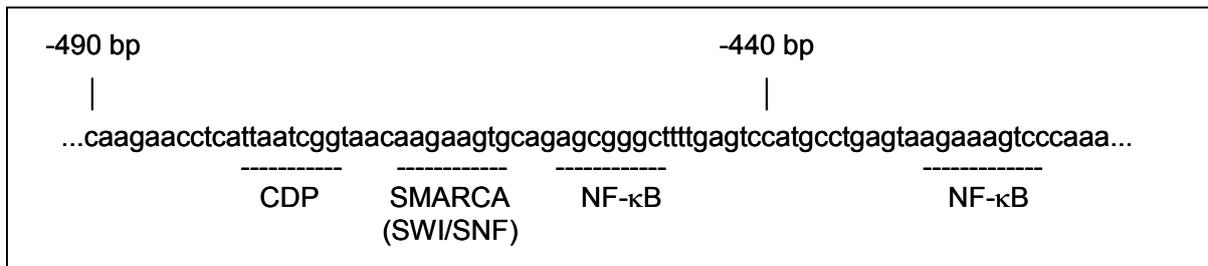


Abbildung 12: Schematische Darstellung ausgewählter putativer Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren. Der Sequenzbereich des humanen ER α -F-Promotors um -490 bp bis -440 bp wurde mit Hilfe der Software MatInspector und Alibaba auf die Bindung potentieller Transkriptionsfaktoren analysiert.

3.3.4 Untersuchung der suppressorischen Wirkung potentieller Transkriptionsfaktoren

Um zu analysieren, ob die durch Datenbankanalyse ermittelten Transkriptionsfaktoren CDP, SMARCA3 (SWI/SNF) und NF- κ B eine Rolle bei der Suppression der Promotoraktivität der hER α -F-Variante spielen, wurden mit Hilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) die putativen Bindungsstellen dieser Transkriptionsfaktoren mutiert (Kap. 2.2.14) und so deren möglicherweise inhibierender Effekt auf die Transkription aufgehoben. Bei allen hergestellten Mutationskonstrukten wurden jeweils zwei Basen innerhalb der putativen Bindungssequenz mutiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass durch die eingeführten Mutationen nicht nur die putative Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors zerstört, sondern auch keine neue Bindungsstelle geschaffen wurde. Die mutierten Expressionskonstrukte wurden in AC16-Zellen transfiziert, und die Promotoraktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays bestimmt. Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, zeigten die Expressionskonstrukte mit den mutierten Bindungsstellen für CDP und NF- κ B innerhalb des Sequenzbereiches von -490 bp bis -440 bp jeweils signifikante Erhöhungen der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur nicht mutierten Promotor-F-Sequenz WT-910/-9-pGL2. Hierbei zeigte das M2-910/-9(NF- κ B)-pGL2-Konstrukt eine signifikante dreifache Erhöhung und das M3-910/-9(CDP)-pGL2 Konstrukt eine signifikante vierfache Erhöhung der Luciferase-Aktivität ($p = 0,004$), wohingegen eine veränderte *consensus*-Sequenz für SMARCA3 (SWI/SNF) innerhalb von M4-910/-9(SMARCA3)-pGL2 zu keinem Anstieg der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-Promotorsequenz führte. Die Mutationen innerhalb der zweiten putativen Bindungsstelle für NF- κ B (M1-910/-9(NF- κ B)-pGL2), die weiter stromabwärts und außerhalb des vermuteten Sequenzbereiches mit negativ-regulatorischen Eigenschaften liegt, hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität (Abb. 13).

Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente mit den mutierten Expressionskonstrukten zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren CDP und NF- κ B innerhalb der identifizierten Region im hER α -F-Promotor binden können, SMARCA3 dagegen nicht. Wie erwartet scheint die

zweite, außerhalb des eingegrenzten Bereiches von -490 bp bis -440 bp liegende putative Bindungsstelle für NF- κ B keine funktionelle Bedeutung für die Promotoraktivität in AC16-Zellen zu haben.

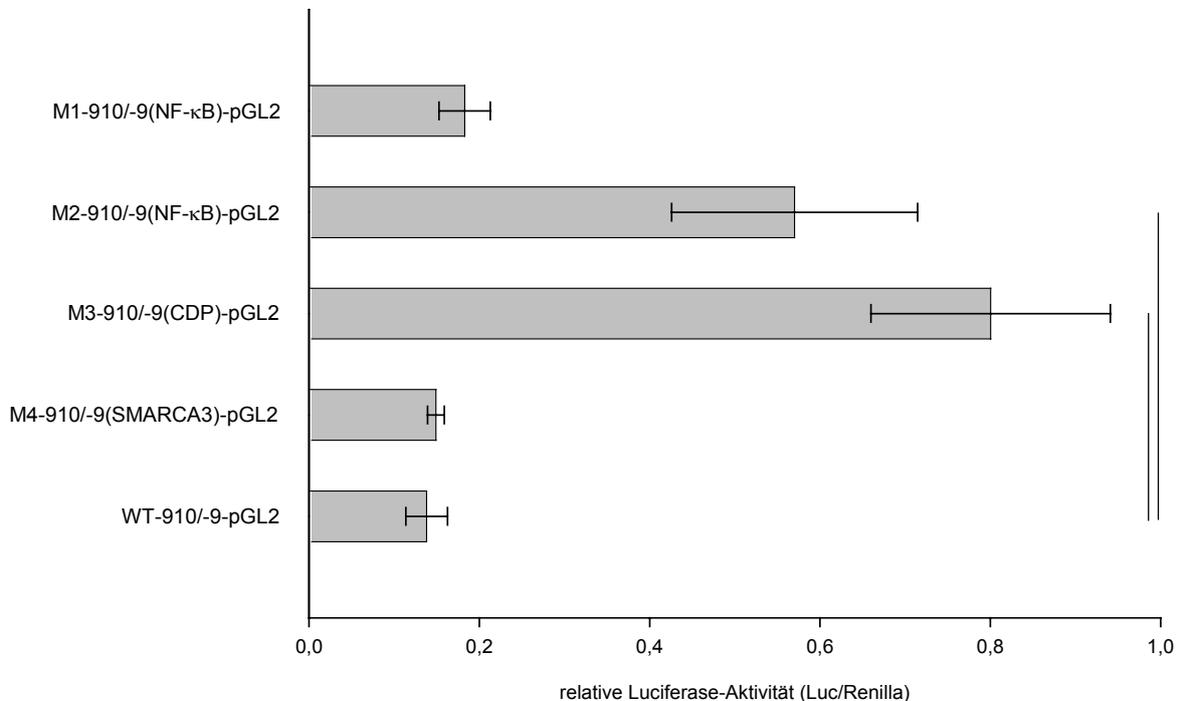


Abbildung 13: Graphische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität der mutierten Promotor-F-Konstrukte in AC16-Zellen. Dargestellt ist die relative Luciferase-Aktivität verschiedener Mutationskonstrukte der humanen Promotorvariante F des ER α -Gens nach transienter Transfektion in AC16-Zellen. Jeweils 1 μ g der mutierten Konstrukte M1-910/-9(NF- κ B)-pGL2, M2-910/-9(NF- κ B)-pGL2, M3-910/-9(CDP)-pGL2, M4-910/-9(SMARCA3)-pGL2 bzw. des Wildtyp-Konstruktes WT(-910/-9)-pGL2 wurden 6 h in AC16-Zellen transient transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden 10 ng des Renilla-Plasmids kotransfiziert. Danach wurde das Transfektionsmedium entfernt und μ N durch VM ersetzt. Die Luciferase-Aktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays gemessen. Die dargestellten Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei bis sechs unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$) \pm SEM. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Zahlen sind Angaben in bp und stehen für die Position innerhalb der Sequenz relativ zum Transkriptionsstartpunkt (+1). * $p = 0,004$ bezogen auf den Ansatz mit WT(-910/-9)-pGL2.

3.3.5 Analyse des humanen ER α -F-Promotors mittels EMSA und Supershift-Assays

Um zu bestätigen, dass es sich um die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CDP und NF- κ B handelt, sollten die an die *cis-acting* Elemente bindenden Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)- und der *Supershift*-Methode identifiziert werden. Dabei sollte der Abschnitt zwischen -486 bp bis -449 bp des hER α -F-Promotors genauer untersucht werden. Dazu wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid

(hESR1-F-oligo-lang-WT), das den Sequenzbereich von -486 bp bis -449 bp umfasst, mit ^{32}P radioaktiv markiert. Für die Analysen wurde es mit 5 μg nukleärem Extrakt aus AC16-Zellen inkubiert. Der Protein-DNA-Komplex wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel mittels Autoradiographie untersucht. Die Spezifität der Wechselwirkung zwischen DNA und Protein konnte überprüft werden, indem dem Ansatz vor Zugabe des ^{32}P -markierten Oligonukleotids ein Überschuss an unmarkierten spezifischen Oligonukleotiden als Kompetitor zugegeben wurde. Zur Identifizierung des gebundenen Proteins wurde der nukleäre Extrakt eine halbe Stunde vor dem Hinzufügen des ^{32}P -markierten spezifischen Oligonukleotids mit einem spezifischen Antikörper inkubiert.

3.3.5.1 EMSA/*Supershift*-Assay mit einem Antikörper gegen NF- κ B p50

In der in Abb. 14 dargestellten Autoradiographie eines Gels ist die elektrophoretische Auftrennung verschiedener Ansätze zu sehen. Die erste Spur enthält die Negativkontrolle, bei der lediglich das ^{32}P -markierte spezifische Oligonukleotid (^{32}P -hESR1-F-oligo-lang-WT) aufgetragen wurde. Die zweite Spur enthält einen Inkubationsansatz, bestehend aus nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen und radioaktiv markiertem spezifischen Oligonukleotid. Das Bandenmuster lässt drei Protein-DNA-Komplexe erkennen.

Die Spezifität der Wechselwirkung zwischen DNA und Protein wurde überprüft, indem der nukleäre Proteinextrakt mit unmarkiertem spezifischen Oligonukleotid in 100-fachem Überschuss (100 pmol) inkubiert wurde und anschließend das ^{32}P -markierte spezifische Oligonukleotid zugegeben wurde (Spur 3). Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass der Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid das markierte Oligonukleotid verdrängt, so dass auch keine Banden mehr sichtbar sind. Folglich handelt es sich bei den drei Banden um Komplexe, die durch spezifische Bindungen der nukleären Proteine an den hER α -F-Promotorbereich zwischen -486 bp bis -449 bp entstanden sind. Um die Identität des Transkriptionsfaktors NF- κ B innerhalb des Protein-DNA-Komplexes zu bestimmen, wurde der nukleäre Extrakt vor dem Hinzufügen des ^{32}P -markierten spezifischen Oligonukleotids mit unterschiedlichen Mengen des spezifischen Antikörpers gegen NF- κ B p50 (2 μg , 4 μg oder 6 μg H-119, Santa Cruz) inkubiert (Spuren 4, 5 und 6). In allen drei Spuren konnte durch die Zugabe des Antikörpers gegen NF- κ B p50 ein *Supershift* detektiert werden. Er ist mit einem Pfeil und „+“ gekennzeichnet. Ein weiterer Hinweis auf die Spezifität des *Supershifts* ist die zu beobachtende Zunahme der Signalstärke proportional zur Antikörperkonzentration, während die Intensität des mittleren *Shifts* proportional zur Antikörperkonzentration abnimmt (Spur 5 und 6; mit einem Pfeil und „-“ gekennzeichnet).

Zusammengefasst konnte mit Hilfe der EMSA- und der *Supershift*-Methode die Bindung der Untereinheit p50 des Transkriptionsfaktors NF- κ B innerhalb der eingegrenzten Sequenz der humanen Promotorvariante F des ER α -Gens nachgewiesen werden.

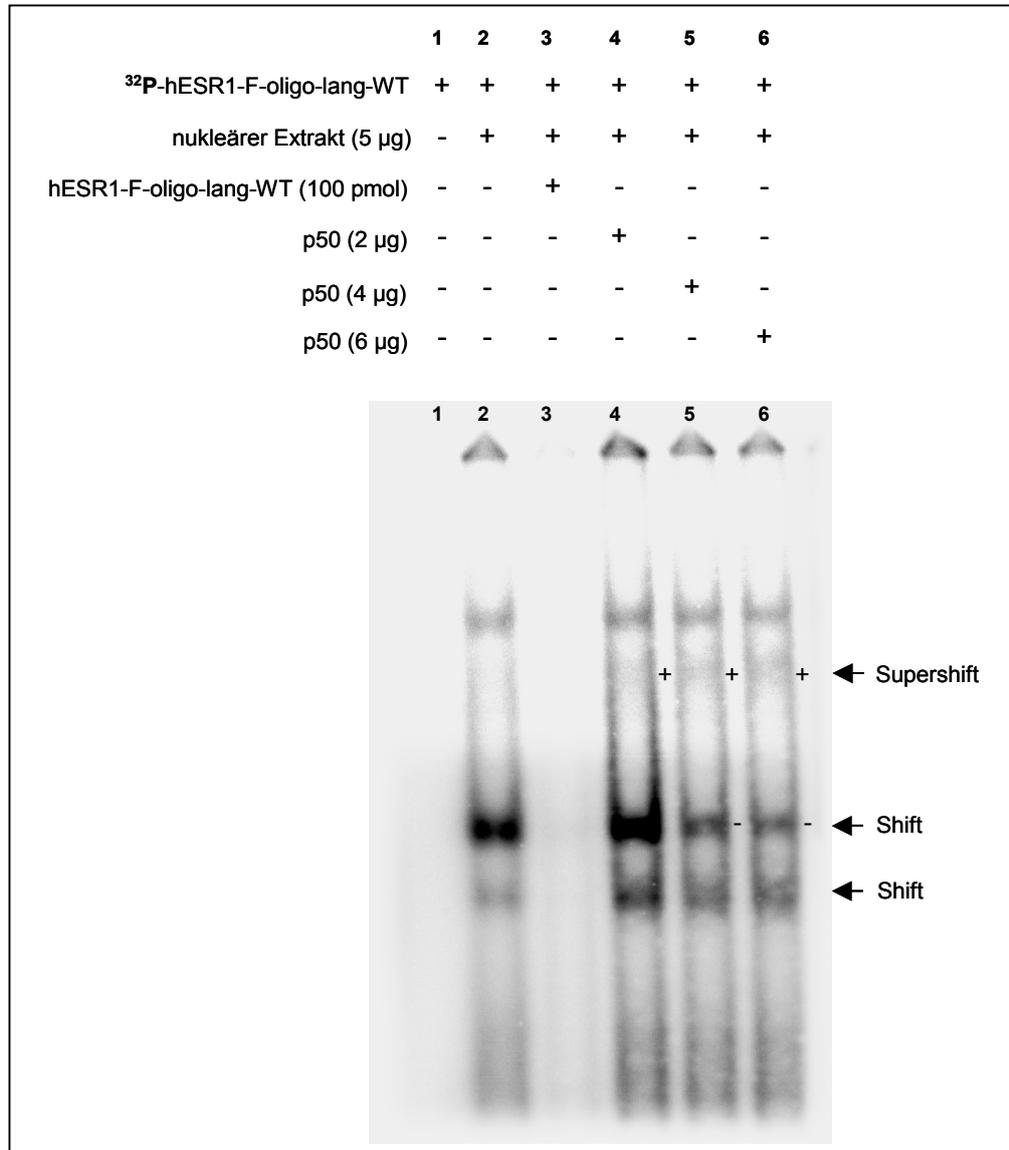


Abbildung 14: EMSA/Supershift-Assay zur Analyse der Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B p50 an den hER α -F-Promotor. Das Oligonukleotid mit der putativen Bindungsstelle für NF- κ B von -486 bp bis -449 bp wurde radioaktiv markiert (³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT). Es wurde mit 5 μ g nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen eine Stunde bei RT inkubiert. Die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mittels Elektrophorese. Die Komplexe wurden anschließend durch Autoradiographie detektiert. In Spur 1 wurde nur spezifisches Oligonukleotid ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT verwendet (Negativkontrolle). In Spur 2 wurde nukleärer Proteinextrakt und ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT eingesetzt. Spur 3 enthält den Kompetitionsansatz, bestehend aus nukleärem Proteinextrakt, ³²P-markiertem Oligonukleotid und einem 100-fachen Überschuss an nicht-radioaktiv markiertem Oligonukleotid. Die Spuren 4-6 (*Supershift*-Assay) enthalten jeweils nukleären Extrakt, markiertes Oligonukleotid und unterschiedliche Mengen des Antikörpers (2 μ g, 4 μ g und 6 μ g H-119, Santa Cruz) gegen NF- κ B p50. Die *Shifts/Supershifts* sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Eine Zu- bzw. Abnahme der Signalstärke ist mit + oder - gekennzeichnet. Die ungebundenen Nukleotide, die sich weiter unten im Gel befanden, wurden abgeschnitten.

3.3.5.2 EMSA/*Supershift*-Assays mit Antikörpern gegen NF- κ B p65 und CDP

Zur Identifizierung der Bindung zweier weiterer möglicher Transkriptionsfaktoren, NF- κ B p65 und CDP, innerhalb des Sequenzbereiches zwischen -486 bp und -449 bp des hER α -F-Promotors, wurden weitere EMSA/*Supershift*-Assays unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Bei CDP handelt es sich um einen bereits durch die Datenbankanalyse ermittelten Transkriptionsfaktor. Darüber hinaus führte die zielgerichtete Mutagenese der putativen CDP-Bindungssequenz zu einem Anstieg der Luciferase-Aktivität nach der transienten Transfektion des Promotorkonstruktes M3-910/-9(CDP)-pGL2 in AC16-Zellen. Dies deutet daraufhin, dass CDP möglicherweise an der repressorischen Wirkung auf die Expression der Promotorvariante F beteiligt ist.

Der Grund für den angestrebten Interaktionsnachweis von NF- κ B p65 mit dem F-Promotor des humanen ER α -Gens liegt in den zahlreichen Arbeiten, die eine hohe Affinität zwischen den beiden NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 und die daraus resultierende bevorzugte Dimerbildung beschreiben¹⁰⁴.

Das mittels Autoradiographie detektierte Bandenmuster ist in Abb. 15 dargestellt. Die Negativkontrolle in Spur 1, bei der nur das radioaktiv markierte Oligonukleotid (³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT) aufgetragen wurde, zeigt kein Signal. Durch die Inkubation von ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT mit AC16-Zellkernextrakt sind drei Banden (mit einem Pfeil gekennzeichnet) zu erkennen, wobei die mittlere Bande das stärkste Signal lieferte (Spur 2). Die Spezifität der Protein-DNA-Bindung wurde durch die Konkurrenz mit dem unmarkierten Oligonukleotid hESR1-F-oligo-lang-WT in 100-fachem Überschuss nachgewiesen (Spur 3). Bei diesem Ansatz waren die Banden nicht mehr detektierbar. Durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen (2 μ g, 4 μ g und 6 μ g) an spezifischen Antikörpern gegen NF- κ B p65 (A, Santa Cruz) und CDP (C-20, Santa Cruz) konnte weder bei p65 (Spuren 4-6) noch bei CDP (Spuren 7-9) ein *Supershift* detektiert werden. Interessanterweise ist bei den *Supershift*-Assays, bei denen höhere Mengen (4 μ g und 6 μ g) an NF- κ B p65-Antikörpern eingesetzt wurden, eine Verringerung der Bandenintensität des mittleren *Shifts* zu erkennen (Spuren 5 und 6). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B p65 und CDP mit Hilfe spezifischer Antikörper nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten. Eine erhöhte Konzentration an NF- κ B p65-Antikörper führte aber, ähnlich wie es beim *Supershift* mit p50 beobachtet werden konnte (Kap. 3.3.5.1), zu einer Abnahme der Signalstärke des Protein-DNA-Komplexes bei einem der drei spezifischen *Shifts*.

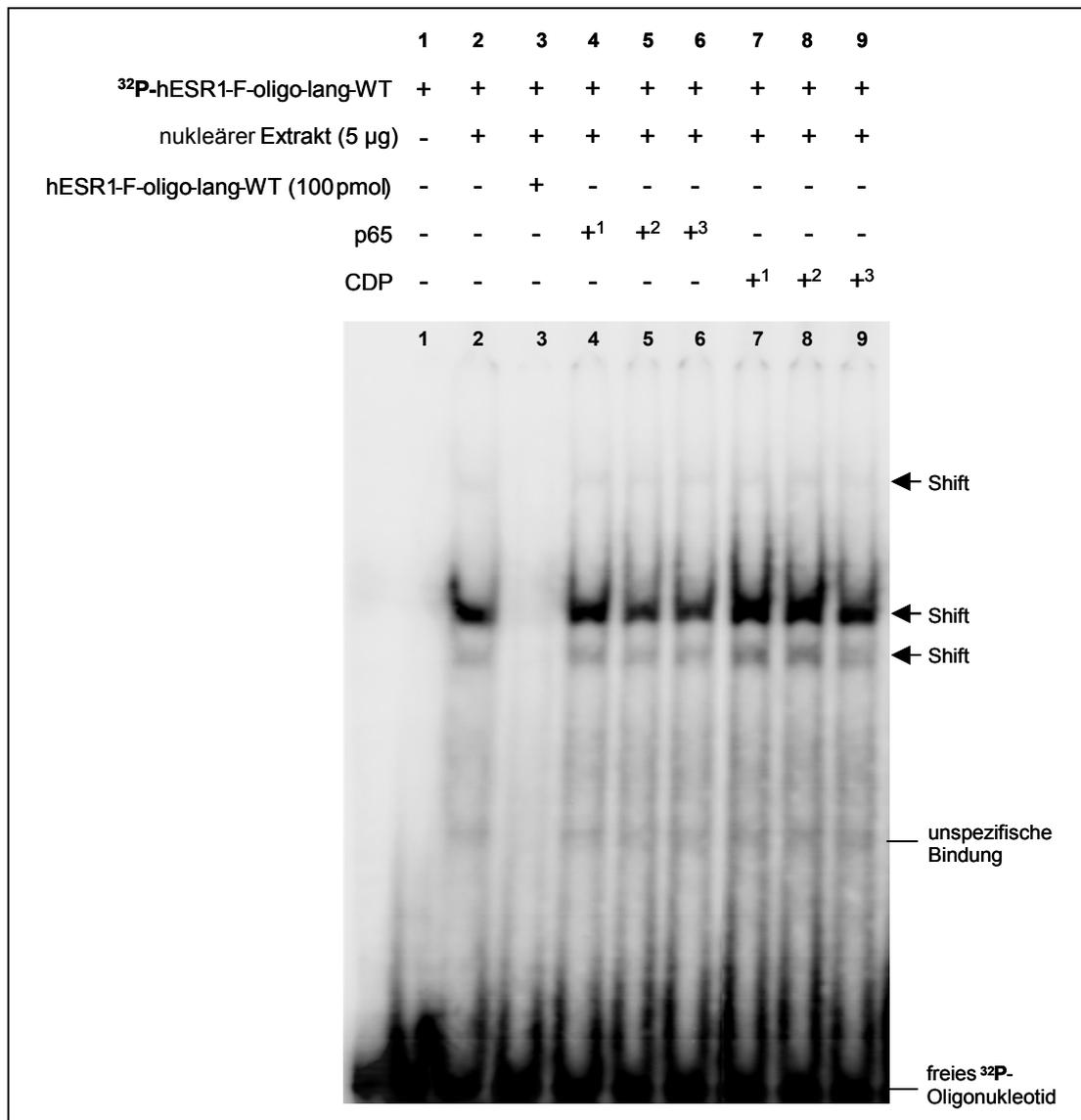


Abbildung 15: EMSA/Supershift-Assay zur Analyse der Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B p65 und CDP an die identifizierten putativen Bindungsstellen innerhalb des hER α -F-Promotors. Das Oligonukleotid mit den putativen Bindungsstellen für NF- κ B und CDP von -486 bp bis -449 bp wurde radioaktiv markiert (³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT). Es wurde mit 5 µg nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen eine Stunde bei RT inkubiert. Die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mittels Elektrophorese. Die Komplexe wurden anschließend durch Autoradiographie detektiert. In Spur 1 wurde nur spezifisches Oligonukleotid ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT verwendet (Negativkontrolle). In Spur 2 wurde nukleärer Proteinextrakt und ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT eingesetzt. Spur 3 enthält den Kompetitionsansatz, bestehend aus nukleärem Proteinextrakt, ³²P-markiertem Oligonukleotid und einem 100-fachen Überschuss an nicht-radioaktivem Oligonukleotid. Für die *Supershift*-Assays wurde der nukleäre Extrakt mit unterschiedlichen Mengen (+¹ = 2 µg, +² = 4 µg und +³ = 6 µg) an spezifischen Antikörpern gegen NF- κ B p65 (A, Santa Cruz) bzw. CDP (C-20, Santa Cruz) 30 min auf Eis vorinkubiert und anschließend ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT zugegeben (NF- κ B p65: Spuren 4-6; CDP: Spuren 7-9). Die *Shifts* sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.3.6 Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion mittels Affinitätschromatographie

Parallel zu den Untersuchungen der Protein-DNA-Wechselwirkungen mittels EMSA wurde eine weitere Methode angewendet, um eventuell noch andere bindende *trans-acting* Elemente zu identifizieren.

Hierfür wurde das spezifische Oligonukleotid an Magnetpartikel gekoppelt und mit dem nukleären Proteinextrakt aus AC16-Zellen inkubiert (Kap. 2.2.31). Die Oligonukleotid-Sequenz war dabei identisch mit der, die für die EMSA/*Superhift*-Assays verwendet wurde. Um die Ausbeute der an die DNA-Sequenz spezifisch bindenden nukleären Proteine zu erhöhen, wurde die Oligonukleotid-Sequenz zuvor mit Hilfe der *self-primed* PCR vervielfältigt (Kap. 2.2.30), wodurch Amplifikate mit mehreren *direct repeats* entstanden. Die optimale Zyklenzahl für die eingesetzten 5'-phosphorylierten Primer lag bei 20 Zyklen (Daten nicht gezeigt). Am Ende der Affinitätschromatographie wurden die an die DNA gebundenen spezifischen Proteine mit Hilfe eines Hochsalzpuffers von den immobilisierten Magnetpartikeln eluiert.

Es wurden jeweils 30 μ l der unterschiedlichen Fraktionen der Affinitätschromatographie auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die anschließende Fixierung und Anfärbung der Proteine erfolgte mit dem Silberfärbungskit Roti®-Black P der Firma Roth (Kap. 2.2.32). Die Abb. 16 zeigt exemplarisch ein silbergefärbtes Gel. Die zweite Spur enthält die Proteine, die nicht an das Multimer (*self-primed* PCR-Produkt) gebunden haben (NB_{Oligo} ; *non binding*). In Spur 3 wurde der Überstand des letzten Waschschrilles (W_{Oligo}) aufgetragen. Wie erwartet, sind in dem Überstand keine Proteine mehr nachweisbar. Spur 5 enthält das Eluat der an die Magnetpartikel und die 16mer-Oligonukleotide gekoppelten synthetischen Oligonukleotide (E_{Oligo}). Deutlich erkennbar ist hier eine Bande bei ~ 30 kDa. Diese Bande repräsentiert den Protein-Komplex, der an die DNA gebunden war. Ein entsprechendes Signal auf gleicher Höhe wurde in der Negativkontrolle (E_{k^-} ; Spur 6) nur schwach detektiert. Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurden die beiden Banden von E_{Oligo} und E_{k^-} (jeweils mit einem Rechteck markiert) aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (Kap. 3.3.6.1) analysiert.

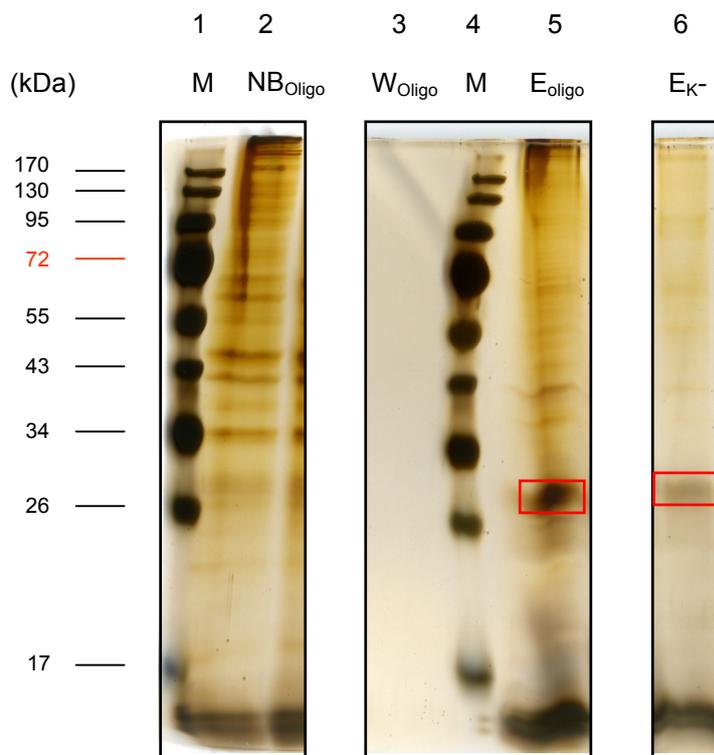


Abbildung 16: Silberfärbung der Proteine nach der Affinitätschromatographie. Die mit Hilfe der Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen (jeweils 30 μ l) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Silber gefärbt (Roti[®]-Black P, Roth). Die Spuren 1 und 4 enthalten jeweils Proteinmarker (PageRuler[™] Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas). Spur 2 enthält die nicht gebundenen Proteine (NB_{Oligo}, *non binding*). In Spur 3 wurde der Überstand des letzten Waschschruttes (W_{Oligo}) aufgetragen. Das Eluat aus dem Ansatz des an die Magnetpartikel und die 16mer-Oligonukleotide gekoppelten synthetischen Oligonukleotide (E_{Oligo}) wurde in Spur 5 aufgetragen. Spur 6 enthält das Eluat der Negativkontrolle (E_{K-}). Die mit einem Rechteck markierten Bereiche (Spuren 5 und 6) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.

3.3.6.1 Identifizierung der DNA-bindenden Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe des Herrn Prof. Dr. Dr. Joachim Klose durchgeführt. Zur Identifizierung der Proteine wurden die in Abb. 16 mit einem Rechteck markierten Banden der Spuren 5 und 6 (E_{Oligo} und E_{K-}) aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt. In der analysierten Bande (\sim 30 kDa) des Ansatzes mit der spezifischen Proteinbindenden Sequenz (E_{Oligo}) konnten verschiedene DNA-bindende Proteine identifiziert werden, darunter das evolutionär hochkonservierte Protein Prohibitin (PHB). Es erreichte die höchste, als sehr sicher einzustufende Qualitätsklasse A. PHB wurde auch in der Negativkontrolle (E_{K-}) identifiziert, jedoch erreichte es hier nur die als unsicher eingestufte Qualitätsklasse C. Die teilweise zu beobachtende Übereinstimmung der identifizierten

Proteine in den Eluaten von E_{Oligo} und E_{k-} kann durch unspezifische Bindungen von nukleären Proteinen an die 16mer-Oligonukleotide erklärt werden.

Tabelle 3: Auflistung der mittels Massenspektrometrie aus dem Silbergel identifizierten Proteine. Die Proteinanalyse wurde mit nanoHPLC-ESI-MS/MS (LCQ DECA XP von Thermo) durchgeführt. Die Suche erfolgte in Mascot gegen die Datenbank NCBI. Qualitätsklassen: A = sehr sicher (mindestens drei unabhängige Proteine mit jeweils 95 %iger Sicherheit); B = sicher (mindestens zwei unabhängige Proteine mit jeweils 95 %iger Sicherheit); C = unsicher (ein Protein mit 95 %iger Sicherheit). MW = *molecular weight* (Molekulargewicht).

Probe	NCBI Accession	MW	Peptide	Mascot Score	Qualitätsklasse	Protein (<i>Homo sapiens</i>)
E _{Oligo}	gi/66365795	21880	5	323	A	Histone cluster 1, H1e
	gi/4885381	22566	4	264	A	Histone cluster 1, H1b
	gi/4505773	29786	3	223	A	Prohibitin
	gi/5902076	27728	3	154	A	Splicing factor, arginine/serine-rich 1
	gi/4506661	29977	2	124	B	Ribosomal protein L7a
	gi/5174449	22474	1	63	C	H1 histone family, member X
	gi/4506725	29579	1	56	C	Ribosomal protein S4, X-linked X isoform
E _{k-}	gi/66365795	21880	5	332	A	Histone cluster 1, H1e
	gi/4885381	22566	4	262	A	Histone cluster 1, H1b
	gi/2896146	24471	2	205	B	Transcriptional coactivator ALY
	gi/4505773	29786	1	114	C	Prohibitin
	gi/5902076	27728	2	113	B	Splicing factor, arginine/serine-rich 1
	gi/4506663	28007	1	76	C	Ribosomal protein L8
	gi/5174449	22474	1	65	C	H1 histone family, member X
	gi/4506661	29977	1	49	C	Ribosomal protein L7a
gi/62087582	15448	1	46	C	H2A histone family, member V isoform 1 variant	

3.3.6.2 EMSA/Supershift-Assay mit Prohibitin

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie (Kap. 3.3.6) und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse (Kap. 3.3.6.1) wurde PHB, ein hoch konserviertes, ubiquitär exprimiertes Protein, identifiziert. In verschiedenen Arbeiten wird dem PHB auch die Funktion eines Tumorsuppressors zugeschrieben.

Um zu beweisen, dass der identifizierte Transkriptionsfaktor PHB innerhalb des zuvor eingegrenzten DNA-Abschnittes bindet, sollte die Protein-DNA-Interaktion durch die EMSA/Supershift-Methode bestätigt werden. Hierzu wurde, wie bereits in Kap. 3.3.5.1 beschrieben, das Oligonukleotid mit der putativen Bindungsstelle für PHB von -486 bp bis -449 bp radioaktiv markiert (³²P-hESR1-F-oligo-lang) und mit nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen inkubiert. Das erhaltene Bandenmuster nach der Autoradiographie ist in Abb. 17 dargestellt. In Spur 1 wurde als Negativkontrolle lediglich das ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT aufgetragen. Die zweite Spur enthielt einen Inkubationsansatz, bestehend aus nukleärem Proteinextrakt und radioaktiv markiertem Oligonukleotid. Dabei konnten drei Banden (*Shifts*, mit Pfeilen gekennzeichnet) detektiert werden. Die Spezifität der Protein-Bindung an den ³²P-markierten DNA-Abschnitt konnte durch die Konkurrenz mit dem unmarkierten spezifischen Oligonukleotid hESR1-F-oligo-lang-WT nachgewiesen werden (Spur 3). Dazu wurde dem Reaktionsansatz mit dem nukleären Proteinextrakt und dem radioaktiv markierten

Oligonukleotid noch zusätzlich unmarkiertes spezifisches Oligonukleotid im 100-fachen Überschuss zugegeben. Der Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid verdrängt das markierte Oligonukleotid, so dass die drei Banden nicht mehr sichtbar sind. Für den *Supershift*-Assay wurde der nukleäre Extrakt mit unterschiedlichen Mengen (1 μg , 2 μg und 3 μg) an spezifischem Antikörper gegen PHB (Ab-1 Clone II-14-10, NeoMarkers) vorinkubiert und anschließend ^{32}P -hESR1-F-oligo-lang-WT zugegeben (Spuren 4-6). In allen drei Spuren konnte kein *Supershift*-Signal detektiert werden.

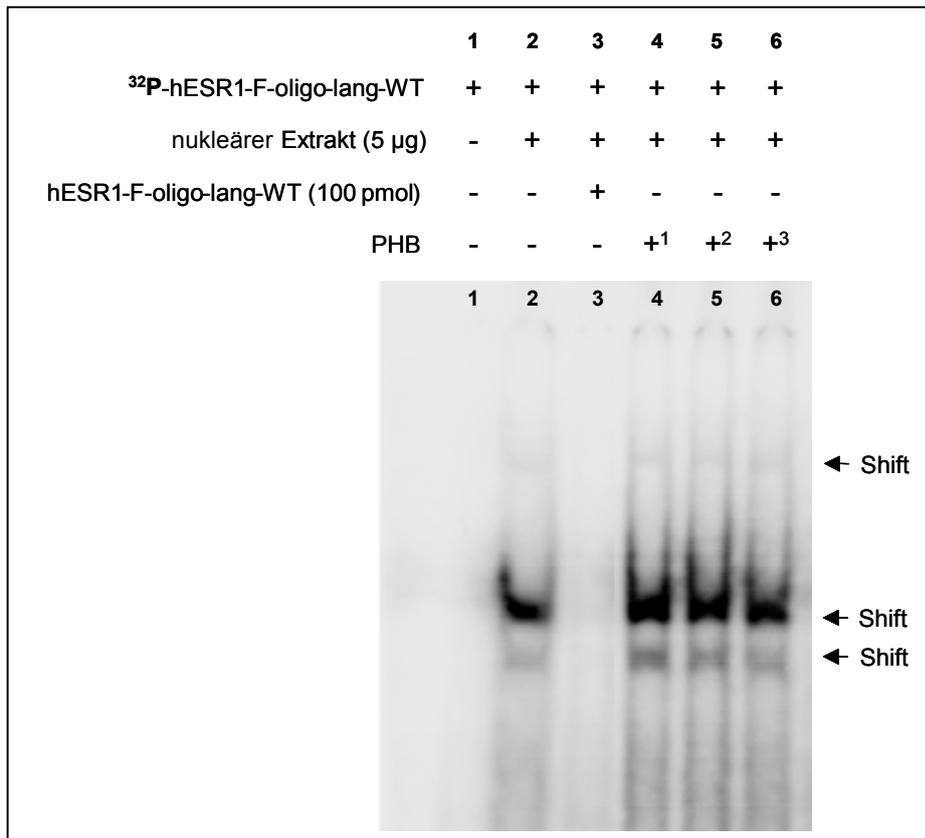


Abbildung 17: EMSA/Supershift-Assay zur Analyse der putativen Bindungsstelle für Prohibitin (PHB) innerhalb des hER α -F-Promotors. Das Oligonukleotid mit der putativen Bindungsstelle für PHB von -486 bp bis -449 bp wurde radioaktiv markiert (^{32}P -hESR1-F-oligo-lang). Anschließend wurde es mit 5 μg nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen eine Stunde bei RT inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht. In Spur 1 wurde nur das spezifische Oligonukleotid ^{32}P -hESR1-F-oligo-lang-WT aufgetragen (Negativkontrolle). Spur 2 enthält nukleären Proteinextrakt und ^{32}P -hESR1-F-oligo-lang-WT. Für die Konkurrenz wurde vor Zugabe des ^{32}P -markierten Oligonukleotids ein 100-facher Überschuss an nicht-radioaktiv markiertem hESR1-F-oligo-lang-WT zugegeben (Spur 3). Für den *Supershift*-Assay wurde der nukleäre Extrakt mit unterschiedlichen Mengen (+¹= 1 μg , +²= 2 μg und +³= 3 μg) an spezifischem Antikörper gegen PHB (Ab-1 Clone II-14-10, NeoMarkers) 30 min auf Eis vorinkubiert und anschließend ^{32}P -hESR1-F-oligo-lang-WT zugegeben (Spuren 4-6). Die *Shifts* sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die unspezifischen Banden, die weiter unten sichtbar waren, wurden abgeschnitten.

3.3.7 Bindungsstudien des Oligonukleotids hESR1-F-oligo-lang-WT mit AC16-Zellkernextrakten mittels *Shift-Western*

Zeitgleich zu den durchgeführten EMSAs wurde mit Hilfe einer weiteren Methode, der sogenannten *Shift-Western*-Methode¹⁰⁵, versucht, die Proteinzusammensetzung des Protein-DNA-Komplexes näher zu analysieren. Die Methode ist eine Kombination aus EMSA und immunologischer Detektion der Bindungspartner.

Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden drei Versuche, EMSA, Coomassie-Färbung und *Shift-Western*, parallel auf einem nativen Polyacrylamidgel durchgeführt (schematische Darstellung Kap. 2.2.29, Abb. 4). Für die EMSA-Methode (Kap. 2.2.28 und folgende) wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT 1 h lang bei RT mit 5 µg nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen inkubiert. Die im EMSA-Gel radioaktiv markierte 72 kDa-Bande des Proteinmarkers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) dient dazu, die mit Hilfe der verschiedenen Methoden nachgewiesenen Protein-DNA-Komplexe miteinander vergleichen zu können. Für den Nachweis der an der DNA-Bindung beteiligten spezifischen Transkriptionsfaktoren durch die *Shift-Western*-Methode enthielten die Inkubationsansätze nukleären Proteinextrakt aus AC16-Zellen und 1 pmol bzw. 50 pmol nicht-radioaktiv markiertes Oligonukleotid hESR1-F-oligo-lang-WT. Um die aufgetragene Proteinmenge mittels Coomassie-Färbung (Kap. 2.2.23) abschätzen zu können, wurden noch zwei weitere nicht-radioaktive Ansätze mit 1 pmol bzw. 50 pmol Oligonukleotid, die ebenfalls zuvor mit nukleärem Proteinextrakt inkubiert worden waren, auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden bei jedem Versuchsansatz in eine Spur 10 µl eines Proteinmarkers aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in drei Teile zerschnitten und diese wurden getrennt voneinander analysiert. Das Bandenmuster des EMSA wurde mittels Autoradiographie detektiert. Die nicht-radioaktiven Bereiche des Polyacrylamidgels wurden nach der Elektrophorese (Kap. 2.2.22) auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (Kap. 2.2.24) bzw. mit Coomassie angefärbt. Die an den gebildeten Protein-DNA-Komplexen beteiligten Proteine wurden immunologisch mittels spezifischer Antikörper gegen NF-κB p50 (H-119, Santa Cruz) und NF-κB p65 (A, Santa Cruz; Daten nicht gezeigt) untersucht (Abb. 18).

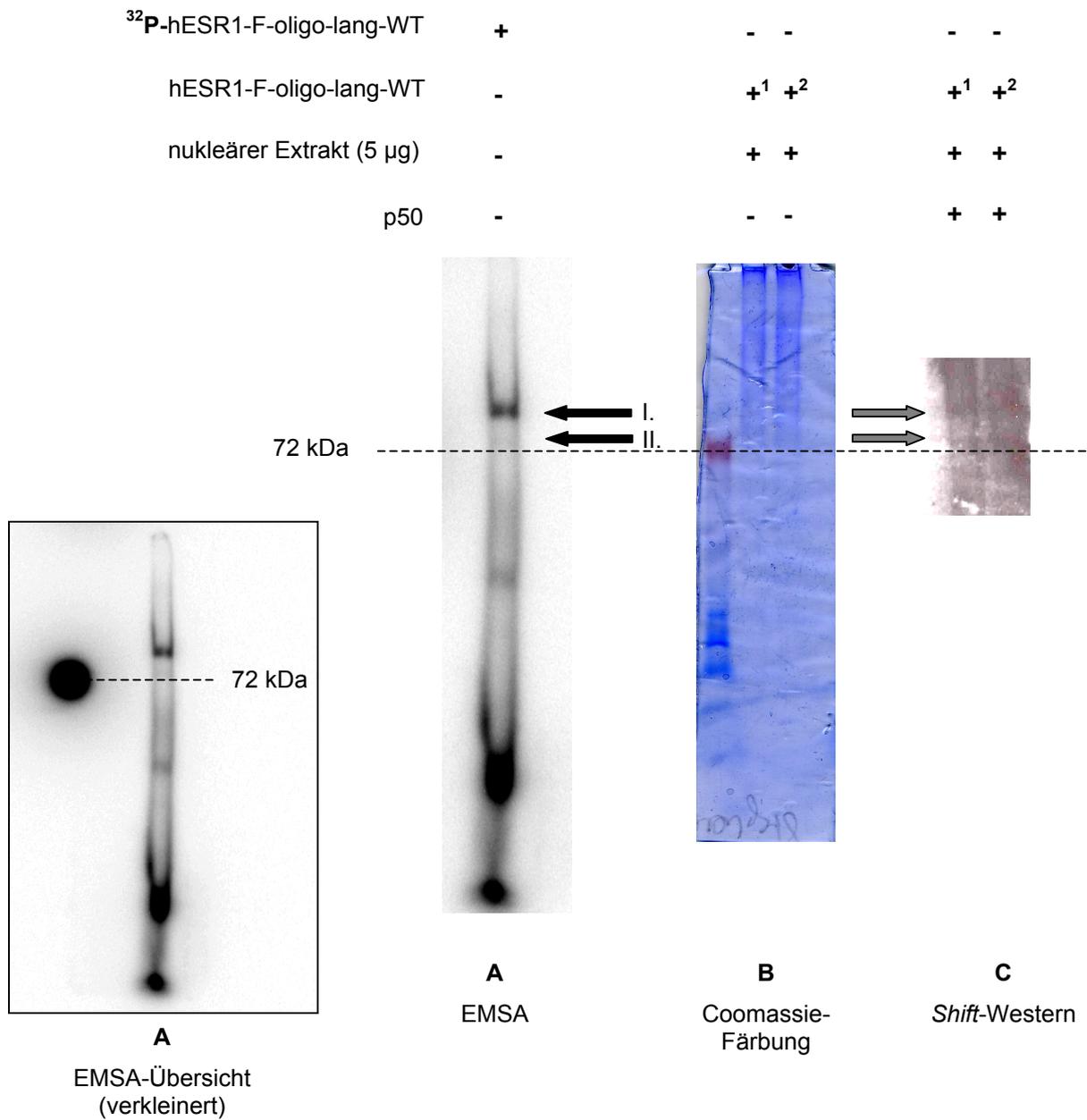


Abbildung 18: Parallelversuch von EMSA, Coomassie-Färbung und Shift-Western. Bei allen Versuchsansätzen wurde das Oligonukleotid ³²P-hESR1-F-oligo-lang-WT bzw. hESR1-F-oligo-lang-WT 1 h bei RT mit 5 µg nukleärem Proteinextrakt aus AC16-Zellen inkubiert und anschließend auf ein 5 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Banden bei der EMSA-Methode mittels Autoradiographie detektiert (A). Für die Coomassie-Färbung wurden die Proteine entsprechend angefärbt (B). Zur Detektion der Proteine mittels Shift-Western wurden sie auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die zwei Spuren enthielten dabei unterschiedliche Mengen an Oligonukleotid (+¹= 1 pmol und +²= 50 pmol). Die an dem Protein-DNA-Komplex beteiligten Proteine wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen die NF-κB-Untereinheit p50 (H-119, Sanza Cruz) untersucht (C). Die Shifts I und II sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Um die Bandenmuster der drei Versuchsansätze miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils zusätzlich 10 µl eines Proteinmarkers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) aufgetragen. Er ist nur bei der Coomassie-Färbung in der linken Spur sichtbar (B), da die entsprechende Spur bei der Abbildung des Shift-Western aus darstellungstechnischen Gründen abgeschnitten wurde (C). Beim EMSA-Gel wurde nach der Elektrophorese die 72 kDa-Bande des Proteinmarkers radioaktiv markiert (A).

Der Vergleich der detektierten Bandenmuster von EMSA und *Shift*-Western in Abb. 18A und 18C zeigt, dass bei beiden Nachweismethoden unmittelbar oberhalb der 72 kDa-Bande, zwei Banden (I. und II., mit Pfeilen gekennzeichnet) auftraten und miteinander zur Deckung gebracht werden können. Da sich die Proteine im nativen Zustand befanden, kann keine Aussage über die tatsächliche Größe der detektierten Proteine bzw. Proteinverbindungen getroffen werden. Dass sich die zwei mit Hilfe des spezifischen NF- κ B p50-Antikörpers detektierten Protein-DNA-Komplexe des *Shift*-Western auf dem Röntgenfilm nicht scharf vom Hintergrund absetzen, kann durch die notwendigerweise lange Expositionszeit (4 h) des Röntgenfilms erklärt werden. Die Spur, bei der nur 1 pmol Oligonukleotid mit nukleärem Extrakt aufgetragen wurde, weist dabei weniger Hintergrund auf, und die zwei Banden sind deutlicher zu erkennen als in der Spur, in der 50 pmol Oligonukleotid aufgetragen wurden. Die in Abb. 18B abgebildete Coomassie-Färbung lässt keinen Unterschied zwischen nukleärem Proteinextrakt, der mit 1 pmol oder 50 pmol inkubiert wurde, erkennen. Die Färbemethode ist nicht sensitiv genug, um Proteine aus insgesamt 5 μ g nukleärem Extrakt in diesem Bereich sichtbar zu machen. Ein immunologischer Nachweis von NF- κ B p65 konnte nicht erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bestätigen die Bindung von NF- κ B p50 innerhalb des hER α -F-Promotors.

3.4 Einfluss von NF- κ B auf den F-Promotor

Die funktionelle Bedeutung des mittels EMSA (Kap. 3.3.5.1) und *Shift*-Western (Kap. 3.3.7) identifizierten Transkriptionsfaktors NF- κ B p50 bei der Regulation des hER α -F-Promotors sollte unter NF- κ B-inhibierenden Bedingungen analysiert werden. Durch die Inkubation der AC16-Zellen mit dem spezifischen NF- κ B-Inhibitor Parthenolid sollte untersucht werden, ob die inhibitorische Eigenschaft von NF- κ B aufgehoben werden kann. Parthenolid ist in der Lage, die Degradation von I κ B- α und I κ B- β zu inhibieren. Dies hat zur Folge, dass diese nicht proteolytisch abgebaut werden. Dadurch wird die Aktivierung von NF- κ B p50 unterbunden, was dazu führt, dass die Translokation von NF- κ B p50 in den Nukleus verhindert wird. Erwartet wurde, dass die Parthenolid-Behandlung zu einer Abnahme der NF- κ B p50-Konzentration im Nukleus führt und es daraufhin zu einem Anstieg der hER α -F-Promotoraktivität kommt.

3.4.1 Inhibition von NF- κ B durch Parthenolid

Um die suppressorische Eigenschaft von NF- κ B p50 auf die Aktivität des F-Promotors des ER α -Gens zu analysieren, wurden die AC16-Zellen mit dem Promotorkonstrukt hESR1-F(-910/-9)-pGL2 6 h transient transfiziert (Kap. 2.2.18.4). Nach einer \bar{u} N-Inkubation wurden die Zellen 6 h mit 10 μ M Parthenolid behandelt. Nach dem Ernten der Zellen wurde die Luciferase-Aktivität mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays (Promega) bestimmt. Wie in Abb. 19 deutlich zu erkennen ist, kommt es nach der Inkubation mit Parthenolid zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den Zellen, die nur mit DMSO behandelt wurden. Die Inhibierung von NF- κ B p50 durch Parthenolid führt also zu einer Verringerung des suppressorischen Effektes von NF- κ B p50 auf den untersuchten Promotorbereich von -910 bp bis -9 bp. Diese Daten liefern den Beweis für die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B p50 bei der transkriptionellen Regulation des hER α -Gens.

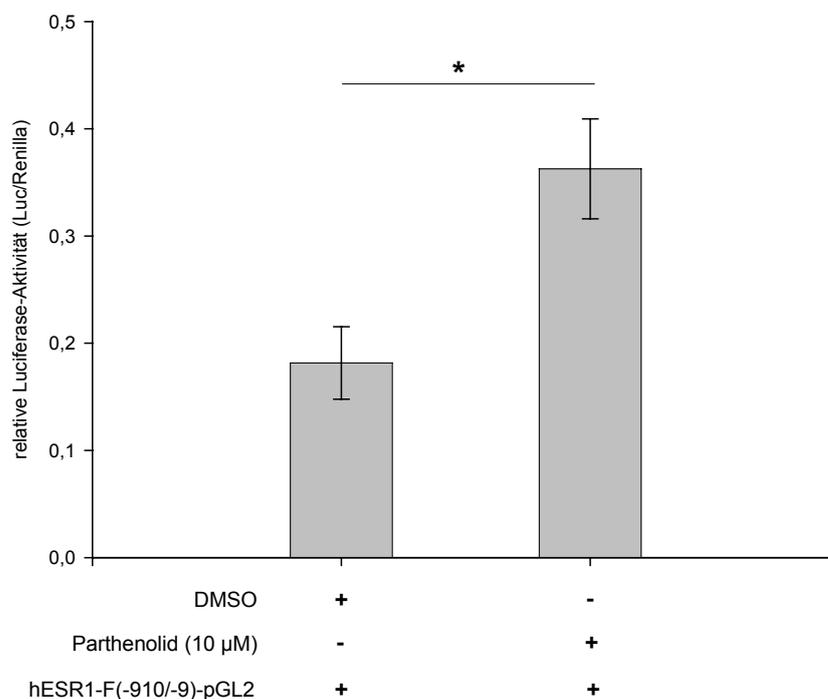


Abbildung 19: Einfluss von NF- κ B auf die transkriptionelle Regulation des hER α -F-Promotors. Dargestellt ist die relative Luciferase-Aktivität von transient transfizierten AC16-Zellen mit hESR1-F(-910/-9)-pGL2. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde das Renilla-Plasmid kotransfiziert. Nach sechsstündiger Transfektion wurden die Zellen 6 h mit Parthenolid (10 μ M) bzw. DMSO behandelt. Alle Experimente wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die dargestellten Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen ($n = 4$) \pm SEM; * $p < 0,001$.

3.4.2 Effekt von Parthenolid auf die Translokation von NF- κ B p50

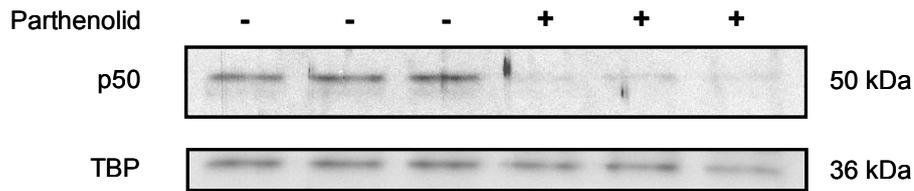
Der vorangegangene Versuch hat gezeigt, dass die Inhibition der NF- κ B p50-Aktivität durch den Einsatz von Parthenolid zu einer signifikanten Erhöhung der Basalaktivität des hESR1-F(-910/-9)-pGL2-Promotorkonstruktes führt. Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob die beobachtete Parthenolid-Wirkung auf Transkriptionsebene durch eine verminderte Verfügbarkeit an NF- κ B p50 im Zellkern hervorgerufen wird.

Mit Hilfe eines immunologischen Nachweises (Western Blot) sollte der direkte Einfluss von Parthenolid auf die Translokation von NF- κ B p50 vom Zytoplasma in den Nukleus nachgewiesen werden. Dazu wurden die AC16-Zellen 6 h mit 10 μ M Parthenolid oder mit DMSO behandelt und anschließend die nukleären Proteine extrahiert (Kap. 2.2.18.5). Für die weiteren Analysen wurden je 5 μ g der nukleären Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 2.2.22), auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet, und NF- κ B p50 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen (H-119, Santa Cruz). TFIID (TBP) diente hierbei als nukleäres Referenzprotein (N-12, Santa Cruz).

Abb. 20A zeigt exemplarisch das Mengenverhältnis von NF- κ B p50 im nukleären Proteinextrakt von AC16-Zellen ohne bzw. mit Parthenolid-Behandlung. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch Applikation von Parthenolid die Translokation von NF- κ B p50 in den Zellkern um annähernd 50 % verringert wurde. Die quantitative Auswertung der Western Blots erfolgte mit Hilfe der AlphaEase-Software. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung sind in Abb. 20B dargestellt.

Die signifikante Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität nach transienter Transfektion der AC16-Zellen mit hESR1-F(-910/-9)-pGL2 und anschließender Parthenolid-Behandlung (Abb. 19) ist also auf die verminderte nukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF- κ B p50 zurückzuführen. Die hier erhaltenen Daten sind ein weiterer Beweis für die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B p50 für die Regulation des hER α -F-Promotors.

A



B

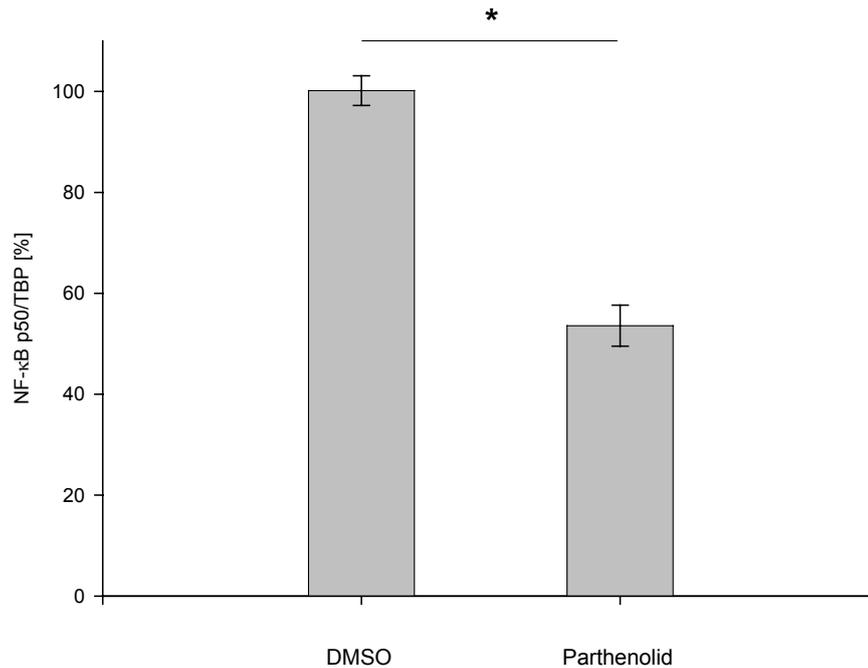


Abbildung 20: Inhibierende Wirkung von Parthenolid auf die Translokation von NF-κB in den Zellkern. Abb. 20A zeigt exemplarisch die Menge an NF-κB p50 und TFIID (TBP) im nukleären Extrakt von AC16-Zellen nach Parthenolid-Behandlung. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-90 % kultiviert und anschließend 6 h mit 10 μM Parthenolid bzw. DMSO behandelt. Jeweils 5 μg nukleäre Proteine wurden aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion von NF-κB p50 erfolgte durch den spezifischen Antikörper H-119 (Santa Cruz). TBP diente hierbei als nukleäres Referenzprotein und wurde mit dem Antikörper N-12 (Santa Cruz) detektiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (Dianova), die ihrerseits mit dem ECL-System (Amersham Bioscience) nachgewiesen wurden. **Abb. 20B** stellt die Quantifizierung der Western Blot-Analysen von AC16-Zellen nach Parthenolid-Behandlung dar. Die immunreaktiven Banden von NF-κB p50 und TFIID (TBP) wurden densitometrisch ausgewertet (AlphaEase). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler (±SEM) von jeweils drei unabhängigen Experimenten (n = 3) in Dreifachbestimmung; *p < 0,001.

3.4.3 Erhöhung der ER α -Expression durch die Inhibierung von NF- κ B

Zur weiteren Charakterisierung wurde mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie untersucht, welchen Einfluss die Inhibition von NF- κ B auf die hER α -Genexpression in AC16-Zellen hat. In Übereinstimmung mit den Western Blot-Daten konnte auch immunhistochemisch die Inhibition der NF- κ B p50-Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus infolge der Parthenolid-Behandlung der AC16-Zellen beobachtet werden. Bei den Zellen, die mit DMSO (Vehikel) behandelt worden waren, konnte NF- κ B als intensives, grün-fluoreszierendes Signal (FITC) in den Zellkernen und in geringerem Maße im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 21A). Dagegen war bei den Parthenolid-behandelten Zellen NF- κ B überwiegend im Zytoplasma und nur in sehr geringen Mengen im Zellkern vorhanden (Abb. 21E). Erwartungsgemäß führte die Parthenolid-Behandlung, verglichen mit den Vehikel-behandelten Zellen, zu einer Hochregulation bzw. Akkumulation von ER α sowohl in den Zellkernen als auch im Zytoplasma (rot-fluoreszierendes Signal, Cy-3, Abb. 21B, F). Die Zellkerne wurden spezifisch mit dem blau-fluoreszierenden Farbstoff DAPI angefärbt (Abb. 21C, G, K). Die kombinierte Darstellung (Overlay) der in den einzelnen Kanälen (FITC, Cy-3 und DAPI) gemessenen Fluoreszenzemissionen ergab keinen Hinweis auf eine mögliche Kolo-kalisation von hER α und NF- κ B p50 (Abb. 21D, H). Als Negativkontrolle dienten Ansätze, bei denen die primären Antikörper gegen NF- κ B p50 und ER α weggelassen wurden (Abb. 21I-L). Die Befunde bestätigen die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors NF- κ B, die Expression des Zielgens hER α zu supprimieren. Zusammenfassend weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass der NF- κ B-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der hER α -Genexpression in AC16-Zellen spielt.

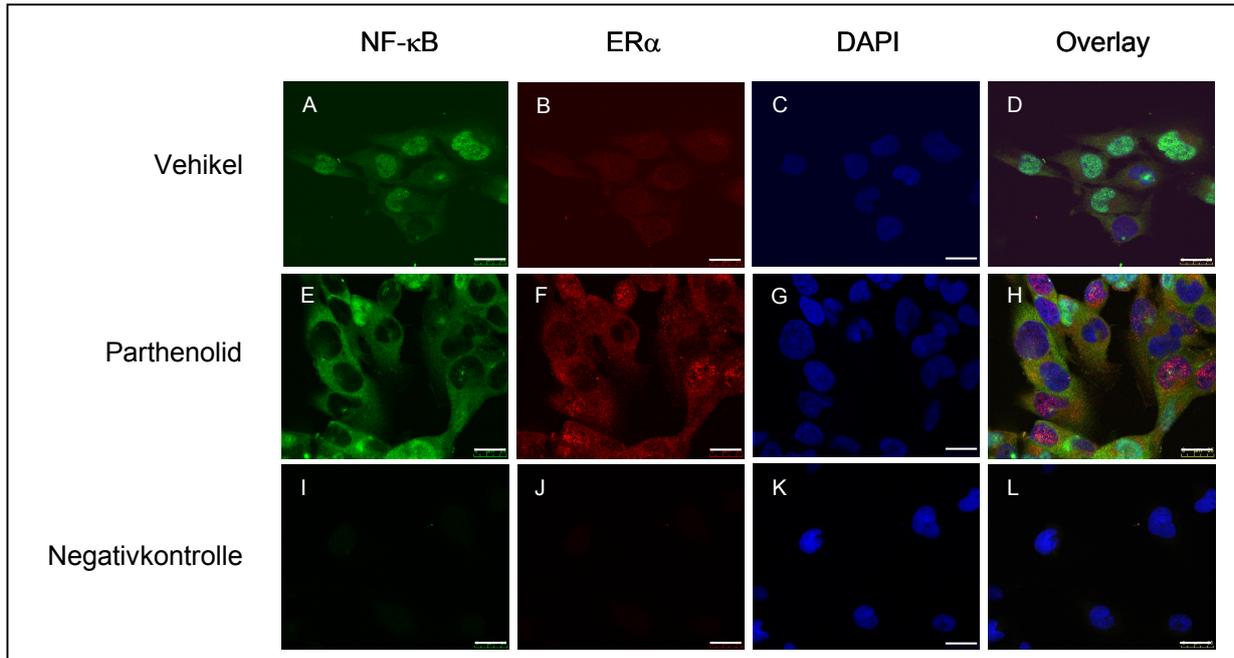


Abbildung 21: Repräsentative konfokalmikroskopische Bilder, die den Effekt der NF- κ B-Inhibition auf die Expression bzw. Akkumulation von ER α zeigen. Die AC16-Zellen wurden mit Vehikel bzw. Parthenolid 6 h behandelt und anschließend fixiert. Der Nachweis von NF- κ B und ER α erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Die grüne Fluoreszenz (FITC) zeigt die Lokalisation von NF- κ B p50 und die rote Fluoreszenz (Cy-3) die Lokalisation von ER α in den AC16-Zellen. **A-B:** In den Zellen, die mit Vehikel behandelt wurden, ist NF- κ B größtenteils in den Zellkernen vertreten, während ER α in geringeren Mengen im Zytoplasma und in den Zellkernen nachgewiesen werden konnte. **E-F:** Im Gegensatz dazu ist bei den Parthenolid-behandelten Zellen NF- κ B überwiegend im Zytoplasma und nur in sehr geringen Mengen im Zellkern vorhanden. In diesen Zellen ist ER α im Zytoplasma und in verstärktem Maße in den Zellkernen anzutreffen im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Zellen. **C, G, K:** Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). **D, H, L:** Die konfokalen Bilder sind das Ergebnis der kombinierten Darstellung der in den einzelnen Kanälen (FITC, Cy-3 und DAPI) gemessenen Fluoreszenzemissionen (Overlay). **I-L:** Gezeigt sind die Negativkontrollen, bei denen jeweils die primären Antikörper gegen NF- κ B p50 bzw. ER α weggelassen wurden. 63-fache Vergrößerung, Skalierungsbalken: 25 μ m.

3.5 Einfluss von 17 β -Östradiol auf die Aktivität von verschiedenen hER α -Promotorvarianten in AC16-Zellen

Um den Effekt von 17 β -Östradiol (E2) auf die Aktivität der im humanen Myokard identifizierten ER α -Promotorvarianten A, B, C und F zu untersuchen, wurden die AC16-Zellen in E2-freiem Medium kultiviert und mit den verschiedenen Promotorkonstrukten transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 48 h mit E2 (10^{-8} M) behandelt. Die ermittelten relativen Luciferase-Aktivitäten aller vier hER α -Promotorvarianten zeigten nach der E2-Behandlung keine signifikanten Änderungen gegenüber den mit Vehikel (Dextrin) behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Dass ER α in der Lage ist, seine eigene Expression zu regulieren (Autoregulation), konnte in Osteosarkomazellen (SaOs) gezeigt werden⁷⁵. Hierbei wurde die Promotorvariante F mit dem

pSG5-hER α 66-Vektor (HEGO) kotransfiziert und anschließend 48 h mit E2 (10^{-8} M) behandelt. Das Ergebnis war eine 50-fache Erhöhung der Promotoraktivität verglichen mit dem Kontrollvektor. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen die einzelnen ER α -Promotorkonstrukte mit HEGO (von Dr. P. Chambon) kotransfiziert und die AC16-Zellen anschließend 48 h mit E2 (10^{-8} M) bzw. Vehikel (Dextrin) behandelt. Um nachzuweisen, dass E2 eine stimulierende Wirkung hat, wurden die AC16-Zellen vor der E2-Behandlung mit dem pS2-pGL3-Reporterkonstrukt transient transfiziert (Positivkontrolle).

Die Ergebnisse der Luciferase-Aktivitätsmessungen sind in Abb. 22 zusammengefasst. Der als Positivkontrolle verwendete pS2-pGL3-Vektor zeigte in allen Versuchen eine signifikante 3- bis 5-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität nach E2-Behandlung im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Ansätzen (Daten nicht gezeigt). Die Kotransfektionen der hER α -Promotorkonstrukte mit dem leeren pSG5-Vektor, ohne die kodierende Sequenz des hER α , führten nach E2-Behandlung zu keinem Anstieg der Luciferase-Aktivität gegenüber dem Vehikel (Daten nicht gezeigt). Es konnte so ausgeschlossen werden, dass allein der pSG5-Vektor einen Einfluss auf die nachfolgend beobachteten Effekte hatte.

Die Kotransfektionen mit den ER α -Vektoren und die anschließende E2-Behandlung führten bei allen Promotorvarianten A, B, C und F zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität im Vergleich zu dem Vehikel ($p < 0,05$). Dabei zeigt der Promotor C den höchsten Anstieg an relativer Luciferase-Aktivität gegenüber den nicht-behandelten Ansätzen. Diese Daten zeigen, dass die hER α -Promotorvarianten C und F in AC16-Zellen nicht nur vorhanden sind, sondern auch eine funktionelle Bedeutung haben.

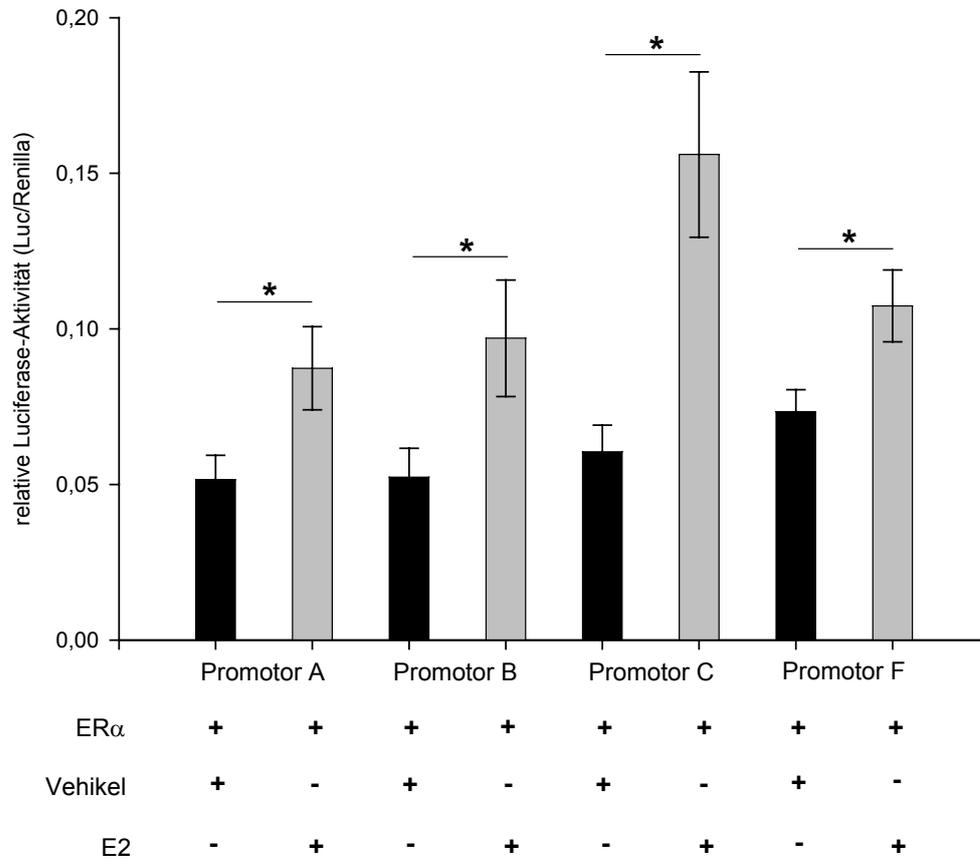


Abbildung 22: Effekt von ER α und E2 auf die transkriptionelle Aktivität der humanen ER α -Promotorvarianten A, B, C und F in AC16-Zellen. Die verschiedenen Luciferase-Reporterkonstrukte der Promotoren A, B, C und F (je 1 μ g) wurden mit pSG5-hER α 66 (HEGO, 100 ng) in AC16-Zellen kotransfiziert. Nach 6 h wurde das Transfektionsmedium entfernt und μ N durch HM ohne PR ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 48 h mit Vehikel (schwarze Balken) oder 10^{-8} M E2 (graue Balken) behandelt. Die Luciferase-Aktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays gemessen. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde das Renilla-Plasmid (10 ng) kotransfiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$) \pm SEM dargestellt. Jeder Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. * $p < 0,05$, bezogen auf den Ansatz mit Vehikel.

4 Diskussion

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Östrogenrezeptoren (ER) eine wichtige Rolle bei der Modulation von kardiovaskulären Erkrankungen beim Menschen und in Tiermodellen spielen. Gegenwärtig ist jedoch unser Wissen darüber, wie die Transkription von ER α gesteuert wird, äußerst limitiert. Wenngleich die unterschiedliche Regulation der ER α -Expression in Zellen und Geweben schon länger bekannt ist, bleibt bis heute unverstanden, welche genaue Bedeutung die einzelnen Promotorvarianten, deren *cis*- und *trans-acting* Elemente sowie ER α selbst und der zelluläre Kontext für die komplexe Regulation der ER α -Expression haben. Um die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen der ER α -Genexpression im kardiovaskulären System sowohl im gesunden als auch im kranken Zustand besser verstehen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung zu verstehen, wie das ER α -Gen reguliert wird. Bislang sind sieben verschiedene Promotorvarianten (A, B, C, D, E, F und T) für das hER α -Gen bekannt⁶⁰. Der Umstand, dass die unterschiedliche Expression von ER α -Transkripten in unterschiedlichen Zellen und Geweben stattfindet, impliziert, dass die Regulation auf der Ebene der verschiedenen Promotoren ein Schlüsselereignis für die ER α -mRNA-Synthese ist⁶⁷. Diese wird, angesichts der enormen Größe der ER α -Promotorregion von über 150 kb, durch zelluläre Transkriptionsfaktoren und epigenetische Phänomene kontrolliert. Der Promotor A des ER α -Gens war der erste Promotor, der identifiziert wurde. Er ist hauptsächlich in Zelllinien aktiv, die relativ viel ER α -mRNA exprimieren. Einige der *cis*- und *trans-acting* Elemente, die an der Regulation der ER α -Expression beteiligt sind, konnten bereits charakterisiert werden (Kap. 1.3.5). Der E-Promotor, der fast ausschließlich in der Leber aktiv ist und ca. 150 kb stromaufwärts des ersten kodierenden Exons von ER α liegt, wird höchstwahrscheinlich in anderen Zellen und Geweben epigenetisch reprimiert.

In der vorliegenden Arbeit konnten in humanen linksventrikulären Myokardproben, die von Spenderherzen (Kontrollen) und von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) stammten, vier 5'-UTR-Varianten des ER α -Gens und deren assoziierte Promotoren A, B, C und F nachgewiesen werden. Zudem wiesen semiquantitative Untersuchungen darauf hin, dass es sich bei der Promotorvariante F um die dominante Form in den Myokardproben handelt. Durch weiterführende funktionelle Analysen der Promotorvariante F konnte nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B p50 innerhalb der Promotorsequenz bindet und so einen supprimierenden Effekt auf die transkriptionelle Aktivität dieser Variante hat. Das in dieser Arbeit etablierte Zellkultursystem für die Promotorstudien ermöglichte es erstmals, die Wirkung des natürlichen Liganden 17 β -Östradiol (E2)

und hER α auf die transkriptionelle Aktivität der im humanen Myokard identifizierten ER α -Promotoren A, B, C und F zu untersuchen. Dabei führte die Kotransfektion mit ER α und die anschließende E2-Behandlung bei allen Promotorvarianten zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität, im Vergleich zu dem Vehikel. Darüber hinaus konnten in diesem System erstmals Hinweise auf die *in vitro*-Aktivität des identifizierten proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B und dessen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des hER α -Gens gewonnen werden, wobei gezeigt werden konnte, dass NF- κ B in der Lage ist, die Expression von hER α negativ zu beeinflussen.

4.1 Charakterisierung der 5'-UTRs und Promotorsequenzen des humanen kardialen ER α -Gens

Um zu untersuchen, wie die ER α -Expression im humanen Herzen reguliert wird, wurde zunächst die 5'-flankierende Region des hER α -Gens in humanem Myokardgewebe des linken Ventrikels charakterisiert. Im weiteren Verlauf wurde mit Hilfe semiquantitativer Methoden die dominante Promotorvariante des hER α -Gens bestimmt und funktionell analysiert.

In 28 untersuchten humanen linksventrikulären Myokardbiopsien (DCM und Kontrollen) konnten vier verschiedene 5'-UTR-Varianten nachgewiesen werden. Das humane Herz enthält folglich die Promotorvarianten A, B, C und F. Die Ergebnisse der 5'-RACE und der semiquantitativen PCR deuten darauf hin, dass die Expression des ER α -Gens überwiegend unter der Kontrolle der Promotorvariante F steht (Tab. 2 und Abb. 5). Verschiedene aktuelle Untersuchungen konnten bereits nachweisen, dass der distal gelegene F-Promotor eine äußerst wichtige Rolle bei der Regulation der hER α -mRNA im Knochen und in primären Osteoblasten spielt ^{75, 106, 107}.

Die Ergebnisse der PCR und der semiquantitativen PCR zeigen, dass es keinen Unterschied bei den verwendeten Promotorvarianten und der dominanten Promotorvariante zwischen DCM und Kontrollen gibt (Kap. 3.1.2 und 3.1.3). Die Tatsache, dass die hER α -Expression krankheitsabhängig reguliert wird ⁶, kann daher nicht allein durch die unterschiedliche Wahl der hER α -Promotoren erklärt werden. Vielmehr scheint hier die Deregulation von zelleigenen Faktoren, wie z. B. von Transkriptionsfaktoren, einen wichtigen Einfluss auf die Expression zu haben. Es konnte zudem in beiden untersuchten Gruppen kein Nachweis für das Vorhandensein der Promotorvarianten D und E erbracht werden. Für die Promotorvariante D bedeutet dies, dass sie im menschlichen Herzen entweder gar nicht vorkommt oder nur in so geringer Menge, dass sie nicht nachgewiesen werden konnte. Letzteres trifft möglicherweise auch auf die Promotorvariante E zu, da Figtree *et al.* erstmalig zeigen konnten, dass das ER α -mRNA-Transkript der Promotorvariante E im humanen Ventrikel vorkommt ¹⁰⁸. Aus

dieser Arbeit geht leider nicht eindeutig hervor, ob die für den PCR-Nachweis verwendeten Biopsien, wie in unserem Fall, dem linken Ventrikel entnommen wurden. Erfolgte die Entnahme der Biopsien aus einem anderen Teil des Herzens, ist es durchaus denkbar, dass eine ungleichmäßige Verteilung der einzelnen Promotorvarianten innerhalb des menschlichen Herzens der Grund für die kontroversen Ergebnisse ist.

Auf eine PCR-Analyse der durch Promotor T initiierten ER α -mRNA wurde in dieser Arbeit verzichtet, da der T-Promotor bisher explizit nur in Testis und Epididymis in signifikanten Mengen nachgewiesen wurde⁵⁹.

Die Wahl der Promotoren trägt maßgeblich zur spezifischen Expression des Rezeptorproteins bei. Auch kann die Menge des synthetisierten Proteins dadurch reguliert werden. So ist beispielsweise in der Brustkrebszelllinie MCF-7, bei der das hER α -Gen von den Promotoren A, B, C, D, E und F exprimiert wird, quantitativ viel hER α -Protein nachweisbar. Hingegen ist im Knochen die Gesamt-hER α -Expression, die hier ausschließlich über den F-Promotor vermittelt wird, sehr viel geringer⁶⁹. Mit anderen Worten, in Zellen und Geweben, in denen nur ein Promotor aktiv ist, häufig auch weniger Protein synthetisiert wird. Dies scheint auf den ersten Blick auf die untersuchten linksventrikulären Herzbiopsien nicht zuzutreffen, da die Transkription des hER α -Gens hier an vier verschiedenen Promotoren initiiert wird, trotzdem aber nur geringe Mengen an hER α -mRNA produziert werden (Abb. 5). Das kann durch den Umstand erklärt werden, dass höchstwahrscheinlich nicht alle vier identifizierten Promotorvarianten in Kardiomyozytenzellen aktiv sind, sondern, da es sich bei den untersuchten Biopsien um Gewebe handelt, noch weitere Zellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen für das breite Spektrum der Promotornutzung im humanen Herzen mitverantwortlich sind. Auf die für die hER α -Promotorstudien verwendete AC16-Zelllinie, die nachweislich nicht direkt onkogenen Ursprungs ist, scheint dies ebenfalls zuzutreffen. Bei ihr wurden mittels PCR die 5'-UTRs der Promotoren C und F nachgewiesen (Abb. 7). Dies sind relativ wenige Promotoren gegenüber der in der semiquantitativen PCR als Positivkontrolle verwendeten MCF-7-Zelllinie, die sehr viel höhere Transkriptmengen synthetisiert (Abb. 5).

4.2 Funktionelle Analysen des hER α -F-Promotors

Für weitere *in vitro*-Untersuchungen wurden zunächst die Kulturbedingungen für eine neue humane linksventrikuläre Kardiomyozyten-Zelllinie (AC16-Zellen; ⁹⁸) optimiert und die erforderlichen Transfektionsbedingungen etabliert. Um die Eignung der AC16-Zellen als transfizierbare permanente humane Zelllinie zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem pGFP-C1-Vektor transient transfiziert. Die ermittelte durchschnittliche Transfektionseffizienz der Transfektionsansätze mit 100.000 Zellen pro well einer 6-well-Zellkulturplatte lag bei 28 % und

bei einer Anzahl von 200.000 ausgesäten Zellen pro well bei 33 % (Abb. 8). Damit liegt die AC16-Zelllinie in einem akzeptablen Wertebereich, was transiente Transfektionsexperimente betrifft.

Davidson *et al.* konnten zeigen, dass die AC16-Zellen ein ähnliches Genexpressionsprofil aufweisen wie adulte Kardiomyozyten⁹⁸. Die Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren GATA4, MYCD und NFATc4 sowie von kardialen und muskelspezifischen Markern, wie z. B. α -kardiales Aktin, α -MHC, β -MHC, α -Aktinin und Cx-40, stellen ein wesentliches Indiz für das Vorhandensein eines kardialen Transkriptionsprogramms dieser Zellen dar. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR nachgewiesen werden, dass die AC16-Zellen beide hER-mRNA-Transkripte (ER α /ER β) exprimieren (Abb. 6) und die Transkription des ER α -Gens von mindestens zwei Promotoren, nämlich Promotor C und F, initiiert wird. Dies macht diese Zelllinie für Promotorstudien besonders interessant, da diese zwei Promotorvarianten, wie bereits oben beschrieben, auch in den untersuchten humanen linksventrikulären Myokardbiopsien nachweislich am stärksten vertreten waren (Tab. 2 und Abb. 5). Durch die partielle Übereinstimmung hinsichtlich der verwendeten Promotorvarianten ist anzunehmen, dass die AC16-Zelle über die erforderlichen Transkriptionsfaktoren verfügt, um die hER α -Promotoraktivität, insbesondere des F-Promotors, zu regulieren. Die AC16-Zellen sind daher und nicht zuletzt wegen der vorhandenen kardialen und muskelspezifischen Marker⁹⁸ ein gutes *in vitro*-Modell für funktionelle Promotorstudien des humanen kardialen ER α -Gens.

Zum Zwecke der Identifizierung wichtiger *cis*- und *trans-acting* Elemente der ER α -Genexpression wurden, ausgehend vom *full length*-Promotor-F-Reporterkonstrukt (-1218 bp bis +359 bp), verschiedene 5'- und 3'-Deletionskonstrukte hergestellt und in den pGL2-basic-Vektor vor das Luciferase-Gen kloniert. Durch die transienten Transfektionen der verschiedenen Luciferase-Reporterkonstrukte in AC16-Zellen wurden mit Hilfe des Luciferase Assay Systems die jeweiligen Expressionsaktivitäten ermittelt (Abb. 11). Die funktionellen Analysen des F-Promotors des hER α -Gens ergaben, dass der Sequenzbereich von -910 bp bis -487 bp ein oder mehrere Enhancer-Elemente und der Bereich von -487 bp bis -457 bp stark negativ-regulatorische Sequenzmotive enthält. Die Suche nach negativen *cis-acting* Elementen, die für die Basalaktivität des F-Promotors in AC16-Zellen verantwortlich sind, wurde daraufhin auf den Sequenzabschnitt von -490 bp bis -440 bp fokussiert.

Durch computergestützte Analysen hinsichtlich potentieller Protein-DNA-Bindungsstellen des Sequenzbereiches um -490 bp bis -440 bp konnten unter anderem drei verschiedene putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CDP, SMARCA3 (SWI/SNF) und NF- κ B identifiziert werden (Abb. 9 und Abb. 12). Um zu überprüfen, ob diese Transkriptionsfaktoren einen supprimierenden Einfluss auf die Luciferase-Aktivität der untersuchten Promotor-F-

Sequenz (-910/-9) haben, wurden die potentiellen Bindungsstellen der *trans-acting* Elemente mutiert. Die Ergebnisse der transienten Transfektionsexperimente zeigen, dass die eingebrachten Mutationen innerhalb der putativen Bindungsstellen für CDP und NF- κ B einen entscheidenden Einfluss auf die Luciferase-Aktivität haben. In beiden Fällen führte die zielgerichtete Mutagenese zu einer signifikanten Erhöhung der basalen Promotor-F-Aktivität in den AC16-Zellen (Abb. 13). Die zielgerichtete Mutagenese eines potentiellen SMARCA3 (SWI/SNF) *consensus*-Bindungsmotivs, das sich direkt zwischen den beiden putativen Bindungsstellen für CDP und NF- κ B befindet, führte zu keinem Anstieg der Luciferase-Aktivität des transient transfizierten Promotorkonstruktes hESR1-F(-910/-9)-pGL2 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13). Die Mutationsanalyse einer zweiten, stromabwärts des oben beschriebenen Sequenzbereichs gelegenen putativen Bindungsstelle für NF- κ B führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Reporterkonstrukt (Abb. 13). Der negativ-regulatorische Bereich innerhalb des F-Promotors konnte also aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auf einen Sequenzabschnitt um -490 bp bis -440 bp eingegrenzt werden.

Das humane *CCAAT displacement protein* (CDP) ist dem *homeodomain* Protein von *Drosophila melanogaster* (Cut) sehr homolog^{109, 110}. In Vertebraten wird dem CDP/Cut eine primär negative regulatorische Bedeutung bei der Genexpression zugesprochen¹¹¹⁻¹¹⁴. An der durch CDP/Cut vermittelten Repression sind mindestens zwei Mechanismen beteiligt. In den meisten Fällen scheint CDP/Cut mit einigen Aktivatoren um die Bindungsstelle zu kompetieren. Diese Eigenschaft verhalf dem Protein zu dem Namen „*CCAAT displacement protein*“^{110, 115, 116}. Zusätzlich verfügt es über zwei aktive Repressor-Domänen, durch deren stabile Bindung an einen Promotor die Genexpression aktiv reprimiert werden kann^{113, 114}. CDP/Cut übt dabei seine Funktion als transkriptioneller Repressor durch die Rekrutierung von Histon-Lysin-Methyltransferasen (HKMT; ¹¹⁷) und Histon-Deacetylasen (HDAC1; ¹¹⁴) aus. Beide Enzymgruppen sind maßgeblich an der Repression der Genexpression der meisten Gene beteiligt. Die Deacetylierung an Histonen führt zu einer Kondensation der Chromatinstruktur und übt damit einen negativen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation aus. Zu den Genen, die epigenetischen Regulationsmechanismen unterliegen, zählt auch ER α ¹¹⁸. Yang *et al.* konnten in diesem Zusammenhang in einer Reihe von ER-negativen Brustkrebszelllinien zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit Trichostatin A, einem Histon-Deacetylase-Inhibitor, zur Re-Expression von ER α -mRNA führte, ohne dabei den Methylierungsstatus der CpG-Inseln zu verändern. Die Re-Expression war dabei abhängig von der Dauer und der Dosis des applizierten Inhibitors¹¹⁹.

Die zielgerichtete Mutagenese der putativen Bindungsstelle von CDP innerhalb des F-Promotors und die anschließende transiente Transfektion des Expressionskonstruktes in

AC16-Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der Promotoraktivität. Die Funktionalität dieses Transkriptionsfaktors konnte jedoch im EMSA-Experiment nicht bestätigt werden. Die Zugabe von unterschiedlichen Mengen an CDP-Antikörper führte zu keinem erkennbaren *Supershift* des Protein-DNA-Komplexes (Abb. 15). Mögliche Erklärungen für die voneinander abweichenden Ergebnisse sind, dass entweder CDP nicht innerhalb der durch den Reporter-Assay identifizierten Region bindet oder der Transkriptionsfaktor nicht isoliert, sondern in einem Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren an den F-Promotor bindet. Die spezifische Antikörper-Erkennungssequenz wäre somit durch andere Proteine maskiert und das CDP nicht mehr vom spezifischen Antikörper detektierbar.

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie, der anschließenden Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-bindenden Proteine und der massenspektrometrischen Analyse einer spezifischen ~30 kDa Bande wurde ein Protein mit dem Namen Prohibitin (PHB) identifiziert (Abb. 16 und Tab. 3). Bisher sind zwei Prohibitine, PHB1 und PHB2, beschrieben. Beide sind miteinander nah verwandt, und die Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Arten wie Hefe¹²⁰, Pflanzen¹²¹, Würmern¹²² und Säugetieren¹²³ ist außerdem hoch konserviert. PHB1 hat eine molare Masse von 30-32 kDa und ist auch als „*B-cell receptor associated protein-32*“ (BAP32) bekannt. PHB2 mit einem Molekulargewicht von ~37 kDa wird in der Literatur auch als „*Prohibitone*“¹²⁴, „*B-cell receptor associated protein-37*“ (BAP37;¹²⁵) oder „*repressor of estrogen receptor action*“ (REA;¹²⁶) bezeichnet. PHB1 und PHB2 sind in der Lage, Homo- und Heterodimere zu bilden. Von beiden Proteinen ist mittlerweile bekannt, dass sie nicht nur im Nukleus vorkommen, sondern darüber hinaus eine aktive Rolle bei der Modulation der Transkription von Genen spielen. Erst kürzlich konnten He *et al.* zeigen, dass PHB1 ein potenter transkriptioneller Korepressor für ER α ist¹²⁷. Die Überexpression von PHB1 inhibierte dabei die transkriptionelle Aktivität von ER α in MCF-7-Zellen, während die Verringerung von endogenem PHB1 die Expression von ER α -Zielgenen erhöhte. Ähnlich wie bereits für CDP beschrieben, sind PHB1 und PHB2 in der Lage, HDAC zu rekrutieren^{128, 129}.

Der Zusammenhang zwischen dem detektierten PHB und der mittels Datenbankanalyse identifizierten putativen Bindungsstelle für SMARCA3 (SWI/SNF) wird im weiteren Verlauf deutlich. Die Gene *brg-1* und *brm* kodieren für zwei ATP-abhängige Enzyme, die zentrale Bestandteile des SWI/SNF-Komplexes sind. Die Rekrutierung dieses Komplexes wurde bisher mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung gebracht. Neuere Untersuchungen über die Assoziation von Retinoblastoma-Protein (RB) und Brg-1/Brm deuten jedoch darauf hin, dass der SWI/SNF-Komplex auch an der Repression der Transkription beteiligt ist^{130, 131}. Der humane SWI/SNF-Chromatin-„remodelling“-Komplex enthält zusätzlich zu Brg-1 und Brm noch andere Faktoren, sogenannte BAFs (*Brg-1-associated factors*). Erst kürzlich konnten

Zhang *et al.* zeigen, dass Brg-1/Brm, BAF155 und BAF170 von verschiedenen Proteinen in unterschiedlicher Weise an einen ER-responsiven Promotor (pS2) rekrutiert werden¹³². Dies war abhängig von der Gegenwart von E2 bzw. eines ER-Antagonisten (4HT oder ICI182780). Die funktionelle Konsequenz der unterschiedlichen Rekrutierung von BAF155 und BAF170 an den gleichen Promotor ist entweder eine nachfolgende Rekrutierung des Koaktivators p300 (Histon-Acetylase) oder des Korepressors HDAC1. Komplexe, die Brg-1/Brm und BAFs enthalten, vermitteln dabei die transkriptionelle Aktivierung von ER-responsiven Genen, wenn sie von einem E2-gebundenen ER rekrutiert werden, vermitteln aber eine suppressorische Wirkung, wenn sie durch Prohibitin von einem E2-Antagonisten-gebundenen ER rekrutiert werden¹³². Dass die mutierte putative Bindungsstelle von SMARCA3 (SWI/SNF) im Luciferase-Assay nicht zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität führte (Abb. 13) und PHB im EMSA/*Supershift*-Assay nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 17), jedoch durch die Affinitätschromatographie und die anschließende massenspektrometrische Analyse, liegt möglicherweise an der Komplexität der beteiligten Transkriptionsfaktoren. Es ist denkbar, dass der Protein-Komplex mit benachbarten DNA-Erkennungssequenzen in Wechselwirkung steht und deshalb in der Lage ist, die durch die zielgerichtete Mutagenese erzeugten Basenaustausche zu tolerieren. Prohibitin bindet so nicht direkt an die DNA, sondern es sind andere Kofaktoren wie zum Beispiel Brg1/Brm oder andere BAFs des SWI/SNF-Komplexes für die direkte Bindung zuständig. Die Maskierung von PHB durch andere Transkriptionsfaktoren könnte erklären, warum der spezifische Antikörper nicht in der Lage ist, PHB im EMSA/*Supershift*-Assay zu detektieren.

4.2.1 Bindung von NF- κ B p50 an den humanen ER α -F-Promotor

Es ist bekannt, dass der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B eine inhibitorische Wirkung auf die Transkription verschiedener Gene ausübt. Um dies auch in dem hier verwendeten Modellsystem zu bestätigen, sollte im weiteren Verlauf mit Hilfe des EMSA und *Supershift*-Assays eine Identifizierung der an den regulatorischen Bereichen bindenden Transkriptionsfaktoren erfolgen.

Der NF- κ B-Signalweg ist bei den Säugetieren evolutionär konserviert und wurde ursprünglich primär mit der Immunantwort in Verbindung gebracht. In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges an zahlreichen kardialen pathologischen Prozessen beteiligt ist. In den Untersuchungen wurden unterschiedliche Inhibitoren des NF- κ B-Signalweges eingesetzt, wobei gezeigt werden konnte, dass NF- κ B eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Herzens spielt, wie z. B. bei kardialer Hypertrophie, myokardialer Zytokinexpression, myokardialem oxidativem Stress, kardialem Remodelling, Autoimmun-Myokarditis, Myokardinfarkt, Verletzung nach Ischämie/Reperfusion

(I/R), Remodelling nach Infarkt, Apoptosis und durch Endotoxin induzierter myokardialer Disfunktion¹³³⁻¹⁴⁹.

Bei NF- κ B handelt es sich um ein dimeres Protein, dessen Monomere zur Rel/NF- κ B-Familie gehören. Bisher konnten in Säugetieren fünf Rel-Proteine identifiziert werden: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50) sowie NF- κ B2 (p52). Die reifen Proteine p50 und p52 werden durch proteolytische Prozessierung aus den Vorläufermolekülen p105 bzw. p100 gebildet. Die Proteine der Rel/NF- κ B-Familie besitzen alle eine sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD), die für die Dimerisierung, DNA-Bindung und Wechselwirkung mit dem Inhibitor I κ B verantwortlich ist, sowie eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS). Eine zusätzliche Transaktivierungsdomäne (*transcriptional activation domain*, TAD) besitzen nur p65, RelB und c-Rel^{150, 151}. In den meisten Fällen bzw. Zelltypen liegt das aktive NF- κ B als Heterodimer (p50/p65) vor¹⁰⁴. Die Homodimere p50/p50 und p65/p65 kommen hingegen seltener vor. Im Zytosol befindet sich NF- κ B durch die Bindung an seinen Inhibitor I κ B überwiegend im inaktiven Zustand. Die I κ B-Familie setzt sich aus den Proteinen I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3 sowie den Vorläufermolekülen p105 und p100 zusammen. Dabei maskieren diese Proteine die NLS-Sequenz der NF- κ B-Proteine durch Interaktion mit deren RHD-Domäne, wodurch die DNA-Bindung und die Translokation der NF- κ B-Proteine in den Nukleus verhindert wird. Die Inhibierung der Untereinheiten p50 und p52 erfolgt durch Bindung an ihre jeweiligen Vorläufermoleküle p105 bzw. p100. Eine Aktivierung von NF- κ B kann durch zahlreiche proinflammatorische Stimuli wie Zytokine oder bakterielle oder virale Infektionen ausgelöst werden (Abb. 23A). I κ B α wird dabei zunächst phosphoryliert, ubiquityliert und anschließend durch das Proteasom degradiert. Durch diesen Prozess wird die Kernlokalisierungssequenz demaskiert und NF- κ B kann in den Zellkern gelangen, wo es Einfluss auf die Transkription der Zielgene nimmt¹⁵⁰. Zu den bekannten Zielgenen gehören Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und Immunrezeptoren¹⁵².

Die Ergebnisse des EMSA/*Supershift*-Assays und des *Shift*-Western (Abb. 14 und Abb. 18) zeigen eindeutig, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B (p50) innerhalb des identifizierten inhibitorischen Bereichs (-486 bp bis -449 bp) des hER α -F-Promotors bindet. NF- κ B hat dabei einen nachweislich negativ-regulatorischen Einfluss auf die ER α -Genexpression in AC16-Zellen. Um herauszufinden, ob sich NF- κ B aus den beiden im Herzen bevorzugten Untereinheiten p50 und p65 zusammensetzt^{133, 153-155}, wurde eine mögliche Beteiligung der NF- κ B-Untereinheit p65 mittels der EMSA-Methode (Abb. 15) und der *Shift*-Western-Methode (Daten nicht gezeigt) mit einem spezifischen Antikörper gegen p65 untersucht. Mit beiden Methoden konnte NF- κ B p65 nicht nachgewiesen werden. Ausgehend von Untersuchungen, die aus der Literatur bekannt sind, ist es wahrscheinlich, dass es sich in diesem Fall um das

Homodimer p50/p50 handelt, da dieses Dimer für seine reprimierende Wirkung auf Transkriptionsebene bekannt ist ¹⁵⁶. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass andere zur Rel/NF- κ B-Familie zugehörige Monomere an der Dimerbildung mit dem hier identifizierten p50 beteiligt sind.

Interessanterweise konnten Lambertini *et al.* nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor Runx2 an der Kontrolle der ER α -Genexpression in humanen Osteoblasten beteiligt ist ¹⁵⁷. Sie identifizierten drei potentielle Runx2-Bindungsstellen Runx2 (a), Runx2 (b) und Runx2 (c) in einem Bereich ungefähr 800 bp stromaufwärts des distal gelegenen Exons F. Sie konnten zeigen, dass bei -117.864 bp (relativ zum ursprünglich von Kos *et al.* beschriebenen Transkriptionsstartpunkt ⁶⁰) das am weitesten distal gelegene Runx2-Motiv, Runx2 (a), als transkriptioneller Repressor fungiert. Die reprimierende Rolle von Runx2 konnte mit Hilfe von Deletions- und Mutationskonstrukten des F-Promotors in der SaOs-2-Zelllinie und in humanen primären Osteoblasten nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte mittels EMSA und ChIP-Analyse der Nachweis für die *in vitro*- und *in vivo*-Rekrutierung von Runx2 an den F-Promotor erbracht werden. Durch die spezifische Inhibition von Runx2 wurde die ER α -Expression in Osteoblasten erhöht. Zusammen mit den eigenen Daten beweist dies, dass die spezifischen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der zellspezifischen transkriptionellen Regulation der heterogenen hER α -Promotoren spielen.

4.3 Inhibition von NF- κ B führt zur Erhöhung der Aktivität des hER α -F-Promotors

In weitergehenden Experimenten zur Untersuchung der Funktionalität des Transkriptionsfaktors NF- κ B konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor für die Regulation der Promotorvariante F wichtig ist. Dazu wurde das Promotor-F-Konstrukt hESR1-F(-910/-9)-pGL2 in die AC16-Zellen transient transfiziert und die Luciferase-Aktivität nach sechsstündiger Parthenolid-Behandlung gemessen. Dies führte zu einer signifikanten Erhöhung der Promotor-F-Aktivität (Abb. 19). Obwohl der molekulare Mechanismus der NF- κ B-Inhibition durch Parthenolid in der letzten Zeit intensiv untersucht wurde, ist er noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen weisen darauf hin, dass Parthenolid die Phosphorylierung von I κ B α und damit dessen Abbau verhindert ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, einen direkten Einfluss auf die DNA-Bindung hat, ohne dabei einen Einfluss auf die I κ B-Degradation zu haben ¹⁶¹, oder andere Signalwege beeinflusst ^{162, 163}. Durch weiterführende immunologische Untersuchungen konnte außerdem eindeutig nachgewiesen werden, dass die Parthenolid-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme von NF- κ B p50 im Nukleus führt (Abb. 20). Parthenolid verhindert die Translokation von NF- κ B p50 in den Nukleus

höchstwahrscheinlich durch eine verminderte I κ B α -Degradationsrate (Abb. 23B), wie bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Die immunhistochemischen Färbungen von AC16-Zellen zeigten ein erhöhtes Vorkommen an hER α im Nukleus und im Zytoplasma im Falle einer Inhibition der NF- κ B-Aktivität mit Parthenolid (Abb. 21). Diese Untersuchungen belegen, dass NF- κ B p50 entscheidend an der Suppression des F-Promotor-induzierten ER α -mRNA-Transkripts in AC16-Zellen beteiligt ist.

In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten konnten Holloway *et al.* zeigen, dass eine erhöhte NF- κ B-Aktivität zur Herunterregulation von ER α in Brustkrebszellen führt¹⁶⁴. Die Inhibition der NF- κ B-Aktivität bewirkte hingegen eine erhöhte ER α -Expression. Studien mit verschiedenen Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Inflammation spielen, konnten sehr deutlich eine reziproke Inhibition von ER und NF- κ B zeigen¹⁶⁵. Um die Konzentration an E2 zu ermitteln, die zur NF- κ B-Inhibition benötigt wird, wurde durch Transfektion eines adenoviralen NF- κ B Luciferase-Reporter-Vektors in die humane Zelllinie Hep89, die ER α stabil exprimiert, die Hepatoma-Zelllinie HepG2 hergestellt¹⁶⁶. Es zeigte sich, dass eine E2-Konzentration von 10^{-10} M oder höher nötig war, um die NF- κ B-Aktivität zu inhibieren. Bei 10^{-11} M oder weniger, was etwa dem postmenopausalen Östrogenlevel entspricht, konnte kein Effekt beobachtet werden¹⁶⁷. Folglich ist nur bei den höheren E2-Konzentrationen ein antiinflammatorischer Effekt zu erwarten.

Die Aktivierung von NF- κ B ist mit zahlreichen Herzerkrankungen assoziiert, wie z. B. Hypertrophie¹⁶⁸⁻¹⁷¹, Myokardinfarkt^{172, 173}, Myokarditis¹⁷⁴, Angina pectoris^{175, 176}, Verletzung nach Ischämie/Reperfusion (I/R)¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ und Arteriosklerose^{180, 181}. NF- κ B ist dabei ein wichtiger Faktor bei der proinflammatorischen Signalübertragung und ist in der Lage, mit den Signalwegen der ER zu interagieren¹⁵⁶. Anhand eines Arbeitsmodells soll das Zusammenspiel der Signalwege von NF- κ B und ER erläutert werden (Abb. 23). ER ist in der Lage, die NF- κ B-Aktivität auf verschiedene Weise zu beeinflussen (Abb. 23C): durch inhibieren der IKK-Aktivität (a), durch inhibieren der Degradation von I κ B (b), durch blockieren der DNA-Bindung von NF- κ B (c), durch die Konkurrenz mit NF- κ B um Kofaktoren (d) und durch die direkte Interaktion mit DNA-gebundenem NF- κ B (e), um so der NF- κ B-vermittelten Transkription entgegenzuwirken¹⁸². Denkbar ist, dass, ähnlich wie es bei den Glucocorticoidrezeptoren bereits gezeigt werden konnte^{183, 184}, es zu einer Protein-Protein-Interaktion von NF- κ B und ER im Zytoplasma kommt (Abb. 23, blauer Doppelpfeil). Parthenolid inhibiert die I κ B-Degradation und verhindert die Translokation von NF- κ B in den Nukleus. Die fehlende Bindung von NF- κ B an den ER α -Promotor führt zu einer erhöhten ER α -Expression. In der Folge verschiebt sich das NF- κ B/ER α -Verhältnis im Zytoplasma und im Zellkern zugunsten von ER α .

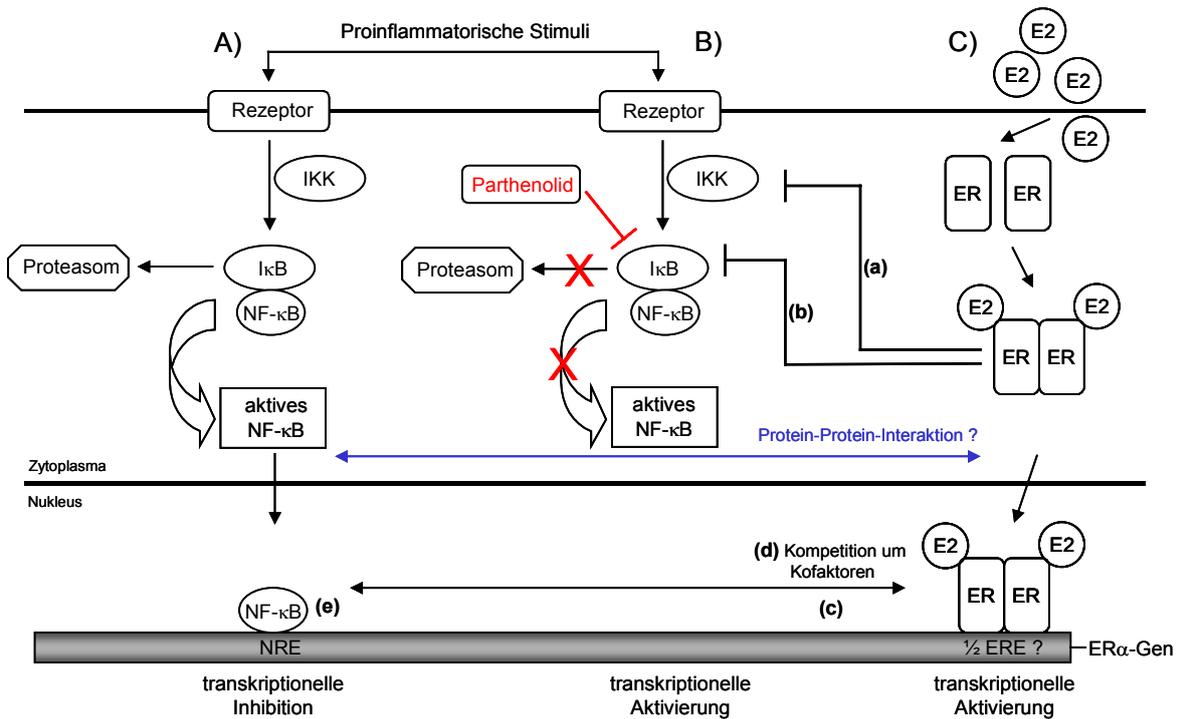


Abbildung 23: Arbeitsmodell über den Einfluss der Signalwege von ER und NF-κB auf die Transkription von ERα.

A: Aktivierung von NF-κB. Bei Säugetieren sind bisher fünf Untereinheiten (RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50/p105) und NF-κB2 (p52/p100)) von NF-κB bekannt, die, wenn sie aktiviert werden, miteinander Homo- oder Heterodimere bilden. Im Cytosol wird NF-κB durch die Bindung an seinen Inhibitor IκB im inaktiven Zustand gehalten. Die Aktivierung von NF-κB kann u. a. durch zahlreiche proinflammatorische Stimuli wie Cytokine (z. B. TNF-α und IL-1β) und bakterielle oder virale Infektionen ausgelöst werden. Diese initiieren Phosphorylierungskaskaden, die zur Aktivierung der IκB-Kinasen (IKK) führen. Die IKK bewirken die Phosphorylierung von IκB. IκB wird im weiteren Verlauf ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom degradiert. Ähnlich wie ER gelangt das aktive NF-κB in den Nucleus, wo es im Promotorbereich zahlreicher Zielgene bindet. Bei Abwesenheit von E2-aktiviertem ER bindet NF-κB innerhalb der ERα-F-Promotorsequenz und inhibiert die Transkription des ERα-Gens.

B: Parthenolid-Wirkung auf die Transkription von ERα. Das Parthenolid verhindert die Phosphorylierung von IκBα und dadurch dessen Degradation. Das Fehlen von NF-κB im Nucleus führt zu einer gesteigerten ERα-Transkription.

C: Durch die Bindung von E2 an die ER-Monomere kommt es zu einer Konformationsänderung und nachfolgenden Dimerisierung der Rezeptorproteine. Nach der Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Nucleus erfolgt die spezifische Bindung direkt über ein ERE (*estrogen responsive element*) oder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren (AP-1 oder SP1) innerhalb des Promotors. In Anwesenheit spezifischer Kofaktoren initiiert ER die Transkription von Zielgenen, darunter auch seine eigene (Autoregulation). ER ist zudem in der Lage die NF-κB-Aktivität auf verschiedene Weise zu beeinflussen: durch inhibieren der IKK-Aktivität (a), durch inhibieren der Degradation von IκB (b), durch blockieren der DNA-Bindung von NF-κB (c), durch Konkurrenz mit NF-κB um Kofaktoren (d) und durch direkte Interaktion mit DNA-gebundenem NF-κB (e), um der NF-κB-vermittelten Transkription entgegenzuwirken (NRE, *nuclear factor-κB responsive element*). Die hypothetische direkte Interaktion von NF-κB und ER im Zytoplasma ist mit einem blauen Doppelpfeil dargestellt (Darstellung in Anlehnung an Kalaitzidis *et al.* ¹⁸²).

In dieser Hinsicht scheint ein Teil der kardioprotektiven Eigenschaften der Östrogene durch ER vermittelt zu werden, wobei die NF- κ B-vermittelte inflammatorische Genaktivierung inhibiert wird^{185, 186} (Abb. 23). So konnten Evans *et al.* in einem Mausmodell eine reziproke *in vivo*-Inhibition zwischen der NF- κ B- und der ER-vermittelten Genexpression in der Leber nachweisen. Die Behandlung von ovariectomierten Mäusen mit 17 α -Ethinylestradiol nach einer vorangegangenen atherogenen Diät führte zu einer Dosis- und Rezeptor-abhängigen Inhibition der NF- κ B-vermittelten Genexpression in der Leber. Die ER-vermittelte Genaktivierung war indes durch die atherogene Diät in der Leber gehemmt¹⁸⁶. In einer Studie mit 226 postmenopausalen Frauen mit einem Durchschnittsalter von 63,5 Jahren und einer etablierten Arteriosklerose in den Koronararterien hatte die Hormontherapie mit E2 keinen signifikanten Effekt auf den Verlauf der Arteriosklerose¹⁵. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass E2 bei einer bereits bestehenden Arteriosklerose wenig bewirkt, wohingegen eine frühzeitige Therapie das Ausmaß der Erkrankung signifikant reduzieren kann¹⁸⁷. Wurde Primaten unter atherogener Diät unmittelbar nach der Ovariectomie E2 verabreicht, so konnte die Ausprägung der Arteriosklerose signifikant verringert werden¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Nach diesen Ergebnissen scheint der Zeitpunkt der Hormonbehandlung im Hinblick auf die Menopause ein wichtiger Faktor zu sein, um den Prozess der arteriosklerotischen Erkrankung zu verlangsamen. Beim Menschen dilatieren nicht erkrankte Koronararterien in Anwesenheit von Östrogen, erkrankte Gefäße dagegen nicht¹⁹¹. Das schlechte Ansprechen des arteriosklerotischen Gewebes auf einen Östrogen-Stimulus ist höchstwahrscheinlich auf einen Mangel an ER in dem betroffenen Gewebe zurückzuführen⁴⁷. Dabei scheint maßgeblich die geringe Expression an ER α innerhalb der arteriosklerotischen Neointima für die Progression der Arteriosklerose verantwortlich zu sein¹⁹². Die Untersuchungen von Nordmeyer *et al.* und Mahmoodzadeh *et al.* zeigten, dass die ER α -Expression in humanen linksventrikulären Biopsien in Patienten mit Aortenklappenstenose (AS) und mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) signifikant erhöht war^{4, 6}. Die Hochregulation von ER α ist möglicherweise ein Weg, einer gesteigerten Expression von NF- κ B entgegenzuwirken und wäre somit kardioprotektiv.

4.4 Effekt von E2 auf die Aktivität der verschiedenen Promotorvarianten von hER α

Es ist bekannt, dass die Transkription von ER α im menschlichen Knochen durch die Promotorvariante F reguliert wird. Denger *et al.* konnten in Osteosarkomzellen (SaOs) zeigen, dass ER α seine eigene Expression in Abhängigkeit von 17 β -Östradiol (E2) regulieren kann⁷⁵. Zum Nachweis der Autoregulation wurde ein 1 kb langer Bereich der Promotorvariante F in den pGL2-basic-Vektor kloniert und zusammen mit dem hER α -Gen (HEGO) kotransfiziert. Danach wurden die Zellen 48 h lang mit E2 (10^{-8} M) behandelt. Das Ergebnis

war eine 50-fache Erhöhung der Promotoraktivität verglichen mit dem Kontrollvektor. Ein ähnlicher Mechanismus von Autoregulation konnte bereits zuvor bei der hER α -Promotorvariante C beobachtet werden⁹⁷.

In Anlehnung an die Arbeit von Denger *et al.* sollte überprüft werden⁷⁵, ob eine Form der Autoregulation auch in humanen Kardiomyozyten (AC16-Zellen) eine Rolle spielt. Die Untersuchungen ergaben, dass es bei allen hER α -Promotorvarianten (A, B, C und F) im Falle einer Kotransfektion mit hER α und der Behandlung mit E2 zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität kommt (Abb. 22). Damit konnte ein autoregulatorischer Mechanismus erstmalig auch in einer humanen Kardiomyozyten-Zelllinie nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die über die Autoregulation einiger ER α -Promotoren durch E2 berichten^{43, 75, 97, 193}, konnte auch hier nachgewiesen werden, dass die E2-vermittelte transkriptionelle Aktivierung der hER α -Promotoren A, B, C und F von hER α abhängig ist.

Die Tatsache, dass die Promotoren A, B und C in MCF-7-Zellen durch E2 herunterreguliert, in ZR-75-, T47-D- und EFM-19-Zellen jedoch hochreguliert werden, weist daraufhin, dass zusätzliche zellspezifische Faktoren darüber bestimmen, in welcher Art und Weise die drei hER α -Promotoren durch E2 beeinflusst werden^{38, 43}. So wird postuliert, dass möglicherweise die vorhandenen halben Östrogen-responsiven Elemente ($\frac{1}{2}$ ERE) innerhalb der verschiedenen hER α -Promotoren für das Zusammenspiel aller Promotoren verantwortlich sind⁴³. Erst kürzlich konnte in Osteoblasten-ähnlichen SaOs-2-Zellen gezeigt werden, dass ER α , c-Jun, c-Fos und ATF2 *in vivo* mit spezifischen Östrogen-responsiven regulatorischen Sequenzen und AP-1-*cis*-Elementen innerhalb des F-Promotors des humanen ER α -Gens interagieren¹⁹⁴. Die betroffenen *cis*-Elemente, AP-1 und $\frac{1}{2}$ ERE (5'-GGTCA-3'), liegen dabei in enger Nachbarschaft zueinander. Die Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion erfolgt dabei oszillierend und wird durch E2 moduliert.

Da die Aktivität des F-Promotors in Osteosarkomazellen nach E2-Behandlung in Abhängigkeit von ER α weitaus höher war (50-fach;⁷⁵) als die in AC16-Zellen (ca. 1,5-fach, Abb. 22) lässt vermuten, dass der Mechanismus der Autoregulation vom Zellkontext abhängig ist. In Kardiomyozytenzellen scheint NF- κ B ein wichtiger Faktor bei der Regulation des F-Promotors zu sein, wohingegen der Promotor C eine erhöhte Aktivität durch einen E2/ER-vermittelten Stimulus aufweist (ca. 3-fach, Abb. 22). So ist vielmehr das Zusammenspiel von *cis*- und *trans-acting* Elementen, epigenetischen Vorgängen und nicht zuletzt die Verwendung von unterschiedlichen Promotorvarianten in einer Zelle für die ER α -Expression verantwortlich.

Momentan ist das Verständnis der regulatorischen Mechanismen, die bei der Transkription von $ER\alpha$ in verschiedenen Geweben eine Rolle spielen, noch sehr lückenhaft. Ein Grund, warum die Erforschung der detaillierten transkriptionellen Regulation des $hER\alpha$ -Gens sich als schwierig erweist, liegt in der mitunter sehr schwachen $ER\alpha$ -Promotor-Grundaktivität in der Mehrzahl der Zellen und Gewebe. Ein weiterer Grund ist die hohe Komplexität der humanen $ER\alpha$ -Promotoren. Der Nachweis von NF- κ B p50 und seine regulatorische Bedeutung für den F-Promotor des $hER\alpha$ -Gens ist ein weiterer wichtiger Schritt, um die komplizierten Vorgänge bei der Transkription des $ER\alpha$ -Gens im humanen Herzen besser zu verstehen. Erst ein detailliertes Verständnis der Interaktionen auf molekularer Ebene ermöglicht es, auch die physiologischen Zusammenhänge besser verstehen zu können und langfristig mögliche Therapieansätze bei verschiedenen Herzerkrankungen zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Die Östrogene üben ihre Wirkung überwiegend durch die Aktivierung der Östrogenrezeptoren ER α und ER β aus. Die Transkription des humanen ER α -Gens kann von sieben verschiedenen Promotoren (A, B, C, D, E, F und T) initiiert werden, deren Transkripte sich alle in der 5'-UTR unterscheiden. Diese Promotoren werden zell- und gewebespezifisch exprimiert. Um die transkriptionelle Regulation des hER α -Gens im humanen Myokard zu untersuchen, wurden zunächst die alternativen 5'-UTR-Varianten des hER α -Gens mittels 5'-RACE, PCR und semiquantitativer PCR identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die ER α -mRNA von den Promotoren A, B, C und F transkribiert werden, von denen der F-Promotor die dominante Variante ist. Für die funktionellen *in vitro*-Studien in der humanen Kardiomyozyten-Zelllinie AC16 wurden Teilbereiche der verschiedenen Promotorsequenzen der vier identifizierten Promotoren amplifiziert und in das pGL2-basic-Luciferase-Reporter-Plasmid kloniert. Die transienten Transfektionsexperimente mit Deletionskonstrukten der Promotorvariante F wiesen auf einen negativ-regulatorischen Bereich zwischen -490 bp und -440 bp hin. Die durch zielgerichtete Mutagenese erzeugten Mutationen innerhalb der putativen NF- κ B- und CDP-Bindungsstellen führten zu einer signifikanten Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Mittels des *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA)/*Supershift*-Assays und des *Shift*-Western konnte die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B p50 an die identifizierte Sequenz innerhalb des F-Promotors des hER α -Gens nachgewiesen werden. Die DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren p65, CDP und PHB konnte hingegen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Inhibition der NF- κ B-Aktivität durch Parthenolid der zuvor mit dem hER α -F-Promotorkonstrukt transient transfizierten AC16-Zellen führte zu einer signifikanten Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des F-Promotors. Weitere Experimente ergaben, dass Parthenolid die Translokation von NF- κ B p50 aus dem Zytoplasma in den Nukleus verhindert und folglich die Konzentration an NF- κ B p50 im Nukleus signifikant reduziert. Die immunhistochemischen Befunde weisen auf ein erhöhtes Vorkommen an hER α im Nukleus und im Zytoplasma im Falle einer Inhibition der NF- κ B-Aktivität hin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der NF- κ B-Signalweg ein Bestandteil des regulatorischen Mechanismus für die Expression von ER α in humanen Kardiomyozyten ist.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 17 β -Östradiol (E2) die transkriptionelle Aktivierung der hER α -Promotoren A, B, C und F in Abhängigkeit von hER α bewirkt. So können letztlich inflammatorische Stimuli durch die Aktivierung und die anschließende Bindung von NF- κ B an den hER α -F-Promotor einen suppressorischen Einfluss auf die hER α -Expression besitzen und E2/hER α einen antagonistischen Effekt auf die ER α -Promotoren im humanen Myokard ausüben.

6 Summary

Estrogens mediate their effects mainly through activation of the estrogen receptors ER α and ER β . The transcription of the human ER α gene can be initiated from seven different promoters (A, B, C, D, E, F and T) whose transcripts all differ in their 5'-UTR. These promoters are expressed in a cell- and tissue-specific manner. To investigate the transcriptional regulation of the hER α gene in the human myocardium, the alternative 5'-UTR variants of the hER α gene were initially identified using 5'-RACE, PCR and semiquantitative PCR. It could be shown that the ER α -mRNA is transcribed from multiple promoters, namely A, B, C and F, of which the F-promoter is the most frequently used variant. For functional *in vitro* studies in the human cardiac myocyte cell line AC16, portions of the different promoter sequences of the four identified promoters were amplified and cloned into the pGL2-basic luciferase reporter plasmid. The transient transfection experiments with deletion constructs of the promoter variant F exhibited a negative regulatory region between -490 bp and -440 bp. The induced mutations via site-directed mutagenesis within the putative NF- κ B and CDP binding sites led to a significant increase of the luciferase activity. Using electrophoretic mobility shift assays (EMSA)/supershift assays and Shift-Western, the binding of the transcription factor NF- κ B p50 to the identified sequence within the F-promoter of the hER α gene could be verified. However, the DNA-binding of the transcription factors p65, CDP and PHB could not be clearly identified. The inhibition of the NF- κ B activity by parthenolide with the prior transiently transfected hER α -F-promoter construct into the AC16 cells led to a significant increase of the transcriptional activity of the F-promoter. Further experiments showed that parthenolide inhibits the translocation of NF- κ B p50 out of the cytoplasm into the nucleus, and consequently significantly decreased the concentration of NF- κ B p50 in the nucleus. The immunohistochemical findings point to an increased occurrence of hER α in the nucleus and in the cytoplasm in the case of inhibition of the NF- κ B activity. These results suggest that the NF- κ B signalling pathway is an integral part of the regulatory mechanism for the expression of ER α in human cardiomyocytes.

In addition it could be shown that 17 β -estradiol (E2) induced the transcriptional activity of the hER α promoters A, B, C and F in a hER α dependent manner. Finally, inflammatory stimuli may suppress hER α expression via activation and subsequent binding of NF- κ B to the hER α F-promoter, and E2/hER α may exert an antagonistic effect on the ER α promoters in the human myocardium.

7 Literatur

1. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. Jun 10 2005;308(5728):1583-1587.
2. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation*. May 1994;89(5):1943-1950.
3. Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation*. Aug 15 1996;94(4):727-733.
4. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, et al. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation*. Nov 16 2004;110(20):3270-3275.
5. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*. Oct 13 1997;416(1):107-112.
6. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, et al. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *Faseb J*. May 2006;20(7):926-934.
7. Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, et al. Heart estrogen receptor alpha: Distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. *J Mol Cell Cardiol*. Sep 2006;41(3):496-510.
8. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. Jun 10 1999;340(23):1801-1811.
9. Mendelsohn ME. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Nov 30 2000;74(5):337-343.
10. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, et al. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation*. Mar 9 1999;99(9):1165-1172.
11. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med*. Sep 12 1991;325(11):756-762.
12. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. Dec 15 1992;117(12):1016-1037.
13. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama*. 2002;288(1):49-57.
14. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288(3):321-333.

15. Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, et al. Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. *N Engl J Med.* Aug 7 2003;349(6):535-545.
16. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama.* 2004;291(14):1701-1712.
17. Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Prog Horm Res.* 1962;18:387-414.
18. Chamness GC, McGuire WL. Estrogen receptor in the rat uterus. Physiological forms and artifacts. *Biochemistry.* Jun 20 1972;11(13):2466-2472.
19. Gorski J, Welshons W, Sakai D. Remodeling the estrogen receptor model. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 1984;36(1-2):11-15.
20. Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* Mar 13-19 1986;320(6058):134-139.
21. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* Mar 7 1986;231(4742):1150-1154.
22. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 1996;93(12):5925-5930.
23. Gosden JR, Middleton PG, Rout D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43(3-4):218-220.
24. Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *Embo J.* Nov 1988;7(11):3385-3388.
25. Walter P, Green S, Greene G, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1985;82(23):7889-7893.
26. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* Aug 19 1996;392(1):49-53.
27. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec 1997;82(12):4258-4265.
28. Kumar V, Green S, Stack G, et al. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* Dec 24 1987;51(6):941-951.
29. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* Oct 2001;81(4):1535-1565.
30. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* Feb 10 1989;56(3):335-344.

31. Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, et al. Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol*. Oct 1993;7(10):1266-1274.
32. Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol*. Jul 1996;3(7):529-536.
33. Kraus WL, Kadonaga JT. p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev*. Feb 1 1998;12(3):331-342.
34. Kraus WL, McInerney EM, Katzenellenbogen BS. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 19 1995;92(26):12314-12318.
35. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. Jun 1999;20(3):321-344.
36. Rachez C, Suldan Z, Ward J, et al. A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev*. Jun 15 1998;12(12):1787-1800.
37. Shibata H, Spencer TE, Onate SA, et al. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res*. 1997;52:141-164; discussion 164-145.
38. Flouriot G, Griffin C, Kenealy M, et al. Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol*. Dec 1998;12(12):1939-1954.
39. Saceda M, Lippman ME, Chambon P, et al. Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Mol Endocrinol*. Dec 1988;2(12):1157-1162.
40. Shupnik MA, Gordon MS, Chin WW. Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Mol Endocrinol*. Apr 1989;3(4):660-665.
41. Read LD, Greene GL, Katzenellenbogen BS. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in human breast cancer cell lines by sex steroid hormones, their antagonists, and growth factors. *Mol Endocrinol*. Feb 1989;3(2):295-304.
42. Clayton SJ, May FE, Westley BR. Insulin-like growth factors control the regulation of oestrogen and progesterone receptor expression by oestrogens. *Mol Cell Endocrinol*. Apr 4 1997;128(1-2):57-68.

43. Donaghue C, Westley BR, May FE. Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen. *Mol Endocrinol*. Nov 1999;13(11):1934-1950.
44. London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, et al. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *Jama*. Feb 19 1992;267(7):941-944.
45. Ali S, Coombes RC. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. Jul 2000;5(3):271-281.
46. Ariazi EA, Ariazi JL, Cordera F, et al. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(3):181-202.
47. Losordo DW, Kearney M, Kim EA, et al. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994;89(4):1501-1510.
48. Core LJ, Lis JT. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science*. Mar 28 2008;319(5871):1791-1792.
49. Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*. Oct 15 2004;18(20):2437-2468.
50. Novina CD, Roy AL. Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet*. Sep 1996;12(9):351-355.
51. Smale ST, Baltimore D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell*. Apr 7 1989;57(1):103-113.
52. O'Shea-Greenfield A, Smale ST. Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*. Jan 15 1992;267(2):1391-1402.
53. Weis L, Reinberg D. Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *Faseb J*. Nov 1992;6(14):3300-3309.
54. Conaway RC, Conaway JW. General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:161-190.
55. Zawel L, Reinberg D. Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:533-561.
56. Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*. Aug 9 1991;66(3):563-576.
57. Chen JL, Attardi LD, Verrijzer CP, et al. Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell*. Oct 7 1994;79(1):93-105.
58. Tjian R. The biochemistry of transcription in eukaryotes: a paradigm for multisubunit regulatory complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Apr 29 1996;351(1339):491-499.

59. Brand H, Kos M, Denger S, et al. A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor alpha in human testis and epididymis. *Endocrinology*. Sep 2002;143(9):3397-3404.
60. Kos M, Reid G, Denger S, et al. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol*. Dec 2001;15(12):2057-2063.
61. Goodrich JA, Cutler G, Tjian R. Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell*. Mar 22 1996;84(6):825-830.
62. Keaveney M, Klug J, Dawson MT, et al. Evidence for a previously unidentified upstream exon in the human oestrogen receptor gene. *J Mol Endocrinol*. Feb 1991;6(1):111-115.
63. Hirata S, Shoda T, Kato J, et al. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab*. Apr 2003;14(3):124-129.
64. Flouriot G, Brand H, Seraphin B, et al. Natural trans-spliced mRNAs are generated from the human estrogen receptor-alpha (hER alpha) gene. *J Biol Chem*. Jul 19 2002;277(29):26244-26251.
65. Grandien K. Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform. *Mol Cell Endocrinol*. Feb 5 1996;116(2):207-212.
66. Thompson DA, McPherson LA, Carmeci C, et al. Identification of two estrogen receptor transcripts with novel 5' exons isolated from a MCF7 cDNA library. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Jun 1997;62(2-3):143-153.
67. Reid G, Denger S, Kos M, et al. Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci*. May 2002;59(5):821-831.
68. Flouriot G, Brand H, Denger S, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *Embo J*. Sep 1 2000;19(17):4688-4700.
69. Denger S, Reid G, Kos M, et al. ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol*. Dec 2001;15(12):2064-2077.
70. Longo M, Brama M, Marino M, et al. Interaction of estrogen receptor alpha with protein kinase C alpha and c-Src in osteoblasts during differentiation. *Bone*. Jan 2004;34(1):100-111.
71. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, et al. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 23 2000;97(11):5930-5935.

72. Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15 2003;100(8):4807-4812.
73. Figtree GA, McDonald D, Watkins H, et al. Truncated estrogen receptor alpha 46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003;107(1):120-126.
74. Barraille P, Chinestra P, Bayard F, et al. Alternative initiation of translation accounts for a 67/45 kDa dimorphism of the human estrogen receptor ERalpha. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 2 1999;257(1):84-88.
75. Denger S, Reid G, Brand H, et al. Tissue-specific expression of human ERalpha and ERbeta in the male. *Mol Cell Endocrinol*. Jun 10 2001;178(1-2):155-160.
76. Kos M, O'Brien S, Flouriot G, et al. Tissue-specific expression of multiple mRNA variants of the mouse estrogen receptor alpha gene. *FEBS Lett*. Jul 14 2000;477(1-2):15-20.
77. Hirata S, Koh T, Yamada-Mouri N, et al. The untranslated first exon 'exon 0S' of the rat estrogen receptor (ER) gene. *FEBS Lett*. Oct 7 1996;394(3):371-373.
78. Hirata S, Koh T, Yamada-Mouri N, et al. The novel untranslated first exon "exon 0N" of the rat estrogen receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 23 1996;225(3):849-854.
79. Freyschuss B, Grandien K. The 5' flank of the rat estrogen receptor gene: structural characterization and evidence for tissue- and species-specific promoter utilization. *J Mol Endocrinol*. Dec 1996;17(3):197-206.
80. Griffin C, Flouriot G, Sonntag-Buck V, et al. Identification of novel chicken estrogen receptor-alpha messenger ribonucleic acid isoforms generated by alternative splicing and promoter usage. *Endocrinology*. Nov 1998;139(11):4614-4625.
81. Griffin C, Flouriot G, Sonntag-Buck V, et al. Two functionally different protein isoforms are produced from the chicken estrogen receptor-alpha gene. *Mol Endocrinol*. Sep 1999;13(9):1571-1587.
82. Pakdel F, Metivier R, Flouriot G, et al. Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. *Endocrinology*. Feb 2000;141(2):571-580.
83. Schuur ER, McPherson LA, Yang GP, et al. Genomic structure of the promoters of the human estrogen receptor-alpha gene demonstrate changes in chromatin structure induced by AP2gamma. *J Biol Chem*. May 4 2001;276(18):15519-15526.
84. deConinck EC, McPherson LA, Weigel RJ. Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol Cell Biol*. Apr 1995;15(4):2191-2196.

85. McPherson LA, Baichwal VR, Weigel RJ. Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 29 1997;94(9):4342-4347.
86. Tang Z, Treilleux I, Brown M. A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers. *Mol Cell Biol*. Mar 1997;17(3):1274-1280.
87. Tanimoto K, Eguchi H, Yoshida T, et al. Regulation of estrogen receptor alpha gene mediated by promoter B responsible for its enhanced expression in human breast cancer. *Nucleic Acids Res*. Feb 1 1999;27(3):903-909.
88. Guo S, Sonenshein GE. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol*. Oct 2004;24(19):8681-8690.
89. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet*. Aug 1994;7(4):536-540.
90. Issa JP, Zehnbaauer BA, Civin CI, et al. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res*. Mar 1 1996;56(5):973-977.
91. Issa JP, Baylin SB, Belinsky SA. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res*. Aug 15 1996;56(16):3655-3658.
92. Lapidus RG, Nass SJ, Butash KA, et al. Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res*. Jun 15 1998;58(12):2515-2519.
93. O'Doherty AM, Church SW, Russell SE, et al. Methylation status of oestrogen receptor-alpha gene promoter sequences in human ovarian epithelial cell lines. *Br J Cancer*. Jan 21 2002;86(2):282-284.
94. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. Sep 1999;43(4):985-991.
95. Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, et al. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. Mar 6 2002;94(5):384-390.
96. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*. Oct 31 2001;278(1-2):25-31.
97. Castles CG, Oesterreich S, Hansen R, et al. Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Jun 1997;62(2-3):155-163.
98. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, et al. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2005;39(1):133-147.

99. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.*: Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory press.; 1989.
100. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1977;74(12):5463-5467.
101. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. Oct 5 1990;215(3):403-410.
102. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Aug 15 1970;227(5259):680-685.
103. Blum H, Beiers H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987;8:93-99.
104. Biswas DK, Singh S, Shi Q, et al. Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Sci STKE*. Jun 14 2005;2005(288):pe27.
105. Demczuk S, Harbers M, Vennstrom B. Identification and analysis of all components of a gel retardation assay by combination with immunoblotting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1 1993;90(7):2574-2578.
106. Lambertini E, Penolazzi L, Giordano S, et al. Expression of the human oestrogen receptor-alpha gene is regulated by promoter F in MG-63 osteoblastic cells. *Biochem J*. Jun 15 2003;372(Pt 3):831-839.
107. Penolazzi L, Lambertini E, Giordano S, et al. Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Jun 2004;91(1-2):1-9.
108. Figtree GA, Kindmark A, Lind L, et al. Novel estrogen receptor alpha promoter polymorphism increases ventricular hypertrophic response to hypertension. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Feb 2007;103(2):110-118.
109. Blochlinger K, Bodmer R, Jack J, et al. Primary structure and expression of a product from cut, a locus involved in specifying sensory organ identity in Drosophila. *Nature*. Jun 16 1988;333(6174):629-635.
110. Neufeld EJ, Skalnik DG, Lievens PM, et al. Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, cut. *Nat Genet*. Apr 1992;1(1):50-55.
111. Lievens PM, Donady JJ, Tufarelli C, et al. Repressor activity of CCAAT displacement protein in HL-60 myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. May 26 1995;270(21):12745-12750.
112. Luo W, Skalnik DG. CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91phox promoter. *J Biol Chem*. Jul 26 1996;271(30):18203-18210.

113. Mailly F, Berube G, Harada R, et al. The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Mol Cell Biol*. Oct 1996;16(10):5346-5357.
114. Li S, Moy L, Pittman N, et al. Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *J Biol Chem*. Mar 19 1999;274(12):7803-7815.
115. Barberis A, Superti-Furga G, Busslinger M. Mutually exclusive interaction of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promoter. *Cell*. Jul 31 1987;50(3):347-359.
116. Skalnik DG, Strauss EC, Orkin SH. CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J Biol Chem*. Sep 5 1991;266(25):16736-16744.
117. Nishio H, Walsh MJ. CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 3 2004;101(31):11257-11262.
118. Pinzone JJ, Stevenson H, Strobl JS, et al. Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression. *Mol Cell Biol*. Jun 2004;24(11):4605-4612.
119. Yang X, Ferguson AT, Nass SJ, et al. Transcriptional activation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*. Dec 15 2000;60(24):6890-6894.
120. McClung JK, Jupe ER, Liu XT, et al. Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression. *Exp Gerontol*. Mar-Apr 1995;30(2):99-124.
121. Snedden WA, Fromm H. Characterization of the plant homologue of prohibitin, a gene associated with antiproliferative activity in mammalian cells. *Plant Mol Biol*. Mar 1997;33(4):753-756.
122. Loukas A, Maizels RM. Cloning and characterisation of a prohibitin gene from infective larvae of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *DNA Seq*. 1998;9(5-6):323-328.
123. Sato T, Saito H, Swensen J, et al. The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer. *Cancer Res*. Mar 15 1992;52(6):1643-1646.
124. Lamers MC, Bacher S. Prohibitin and prohibitone, ubiquitous and abundant proteins that are reluctant to reveal their real identity. *Int Arch Allergy Immunol*. May-Jul 1997;113(1-3):146-149.
125. Terashima M, Kim KM, Adachi T, et al. The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *Embo J*. Aug 15 1994;13(16):3782-3792.

126. Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, et al. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 8 1999;96(12):6947-6952.
127. He B, Feng Q, Mukherjee A, et al. A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Mol Endocrinol*. Feb 2008;22(2):344-360.
128. Kurtev V, Margueron R, Kroboth K, et al. Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem*. Jun 4 2004;279(23):24834-24843.
129. Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J, et al. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene*. Dec 5 2002;21(55):8388-8396.
130. Dunaief JL, Strober BE, Guha S, et al. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*. Oct 7 1994;79(1):119-130.
131. Strobeck MW, Knudsen KE, Fribourg AF, et al. BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 5 2000;97(14):7748-7753.
132. Zhang B, Chambers KJ, Faller DV, et al. Reprogramming of the SWI/SNF complex for co-activation or co-repression in prohibitin-mediated estrogen receptor regulation. *Oncogene*. Nov 1 2007;26(50):7153-7157.
133. Dawn B, Xuan YT, Marian M, et al. Cardiac-specific abrogation of NF- kappa B activation in mice by transdominant expression of a mutant I kappa B alpha. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 2001;33(1):161-173.
134. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. Aug 12 1994;265(5174):956-959.
135. Luss H, Schmitz W, Neumann J. A proteasome inhibitor confers cardioprotection. *Cardiovasc Res*. Apr 2002;54(1):140-151.
136. Meiners S, Hocher B, Weller A, et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome. *Hypertension*. Oct 2004;44(4):471-477.
137. Meiners S, Laule M, Rother W, et al. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation*. Jan 29 2002;105(4):483-489.
138. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med*. Aug 1997;3(8):894-899.
139. Newman WH, Zunzunegui RG, Warejcka DJ, et al. A reactive oxygen-generating system activates nuclear factor-kappaB and releases tumor necrosis factor-alpha in coronary smooth muscle cells. *J Surg Res*. Jul 1999;85(1):142-147.

140. Sakaguchi T, Sawa Y, Fukushima N, et al. A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor-kappaB in myocardial preservation. *Ann Thorac Surg*. Feb 2001;71(2):624-629; discussion 629-630.
141. Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, et al. A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element 'decoy' against NFkappaB binding site: evidence for a role of NFkappaB in ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. Nov 4 1997;96(9 Suppl):II-280-284; discussion II-285.
142. Stangl K, Gunther C, Frank T, et al. Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 1 2002;291(3):542-549.
143. Tomita N, Morishita R, Tomita S, et al. Transcription factor decoy for nuclear factor-kappaB inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *J Hypertens*. Jul 1998;16(7):993-1000.
144. Trescher K, Bernecker O, Fellner B, et al. Adenovirus-mediated overexpression of inhibitor kappa B-alpha attenuates postinfarct remodeling in the rat heart. *Eur J Cardiothorac Surg*. Nov 2004;26(5):960-967.
145. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, et al. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J*. Nov 1 2002;367(Pt 3):729-740.
146. Wright G, Singh IS, Hasday JD, et al. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF-kappaB activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2002;282(3):H872-879.
147. Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, et al. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*. Sep 17 1999;274(38):27307-27314.
148. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*. Nov 5 1998;396(6706):77-80.
149. Yokoseki O, Suzuki J, Kitabayashi H, et al. cis Element decoy against nuclear factor-kappaB attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circ Res*. Nov 9 2001;89(10):899-906.
150. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-663.
151. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. Mar 2002;3(3):221-227.
152. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. Nov 22 1999;18(49):6853-6866.

153. Haudek SB, Bryant DD, Giroir BP. Differential regulation of myocardial NF kappa B following acute or chronic TNF-alpha exposure. *J Mol Cell Cardiol.* Jun 2001;33(6):1263-1271.
154. Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, et al. Overexpression of cardiac I-kappaBalpha prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Mar 2001;280(3):H962-968.
155. Kubota T, Miyagishima M, Frye CS, et al. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Jul 2001;33(7):1331-1344.
156. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev.* Aug 1999;20(4):435-459.
157. Lambertini E, Penolazzi L, Tavanti E, et al. Human estrogen receptor alpha gene is a target of Runx2 transcription factor in osteoblasts. *Exp Cell Res.* May 1 2007;313(8):1548-1560.
158. Zingarelli B, Hake PW, Denenberg A, et al. Sesquiterpene lactone parthenolide, an inhibitor of I kappa B kinase complex and nuclear factor-kappa B, exerts beneficial effects in myocardial reperfusion injury. *Shock.* Feb 2002;17(2):127-134.
159. Lopez-Franco O, Suzuki Y, Sanjuan G, et al. Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *Am J Pathol.* Oct 2002;161(4):1497-1505.
160. Hehner SP, Hofmann TG, Droge W, et al. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *J Immunol.* Nov 15 1999;163(10):5617-5623.
161. Sheehan M, Wong HR, Hake PW, et al. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappa B pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol.* May 2002;61(5):953-963.
162. Won YK, Ong CN, Shi X, et al. Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis.* Aug 2004;25(8):1449-1458.
163. Legendre F, Dudhia J, Pujol JP, et al. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J Biol Chem.* Jan 31 2003;278(5):2903-2912.
164. Holloway JN, Murthy S, El-Ashry D. A cytoplasmic substrate of mitogen-activated protein kinase is responsible for estrogen receptor-alpha down-regulation in breast cancer cells: the role of nuclear factor-kappa B. *Mol Endocrinol.* Jun 2004;18(6):1396-1410.

165. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* Aug 2007;28(5):521-574.
166. Harnish DC, Evans MJ, Scicchitano MS, et al. Estrogen regulation of the apolipoprotein AI gene promoter through transcription cofactor sharing. *J Biol Chem.* Apr 10 1998;273(15):9270-9278.
167. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, et al. The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells. *Endocrinology.* Sep 2000;141(9):3403-3411.
168. Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, et al. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* Feb 2002;34(2):233-240.
169. Purcell NH, Tang G, Yu C, et al. Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 5 2001;98(12):6668-6673.
170. Li Y, Ha T, Gao X, et al. NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Oct 2004;287(4):H1712-1720.
171. Gupta S, Young D, Maitra RK, et al. Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB. *J Mol Biol.* Jan 18 2008;375(3):637-649.
172. Kawano S, Kubota T, Monden Y, et al. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Sep 2006;291(3):H1337-1344.
173. Onai Y, Suzuki J, Maejima Y, et al. Inhibition of NF-kappaB improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jan 2007;292(1):H530-538.
174. O'Donnell SM, Hansberger MW, Connolly JL, et al. Organ-specific roles for transcription factor NF-kappaB in reovirus-induced apoptosis and disease. *J Clin Invest.* Sep 2005;115(9):2341-2350.
175. Ritchie ME. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation.* Oct 27 1998;98(17):1707-1713.
176. Valen G, Hansson GK, Dumitrescu A, et al. Unstable angina activates myocardial heat shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factors NFkappaB and AP-1. *Cardiovasc Res.* Jul 2000;47(1):49-56.
177. Kupatt C, Wichels R, Deiss M, et al. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther.* Apr 2002;9(8):518-526.

178. Li C, Kao RL, Ha T, et al. Early activation of IKKbeta during in vivo myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2001;280(3):H1264-1271.
179. Maulik N, Sasaki H, Addya S, et al. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett*. Nov 17 2000;485(1):7-12.
180. Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, et al. Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation*. Feb 5 2002;105(5):633-638.
181. Wilson SH, Best PJ, Edwards WD, et al. Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis*. Jan 2002;160(1):147-153.
182. Kalaitzidis D, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol Metab*. Mar 2005;16(2):46-52.
183. Widen C, Gustafsson JA, Wikstrom AC. Cytosolic glucocorticoid receptor interaction with nuclear factor-kappa B proteins in rat liver cells. *Biochem J*. Jul 1 2003;373(Pt 1):211-220.
184. Doucas V, Shi Y, Miyamoto S, et al. Cytoplasmic catalytic subunit of protein kinase A mediates cross-repression by NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 24 2000;97(22):11893-11898.
185. Pelzer T, Neumann M, de Jager T, et al. Estrogen effects in the myocardium: inhibition of NF-kappaB DNA binding by estrogen receptor-alpha and -beta. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 7 2001;286(5):1153-1157.
186. Evans MJ, Eckert A, Lai K, et al. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. *Circ Res*. Oct 26 2001;89(9):823-830.
187. Rosenfeld ME, Kauser K, Martin-McNulty B, et al. Estrogen inhibits the initiation of fatty streaks throughout the vasculature but does not inhibit intra-plaque hemorrhage and the progression of established lesions in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. Oct 2002;164(2):251-259.
188. Adams MR, Register TC, Golden DL, et al. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jan 1997;17(1):217-221.
189. Clarkson TB, Anthony MS, Jerome CP. Lack of effect of raloxifene on coronary artery atherosclerosis of postmenopausal monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. Mar 1998;83(3):721-726.
190. Clarkson TB, Anthony MS, Morgan TM. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 2001;86(1):41-47.

-
- 191.** Campisi R, Nathan L, Pampaloni MH, et al. Noninvasive assessment of coronary microcirculatory function in postmenopausal women and effects of short-term and long-term estrogen administration. *Circulation*. Jan 29 2002;105(4):425-430.
 - 192.** Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, et al. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol Cell Endocrinol*. Apr 30 2004;219(1-2):17-26.
 - 193.** Treilleux, Peloux N, Brown M, et al. Human estrogen receptor (ER) gene promoter-P1: estradiol-independent activity and estradiol inducibility in ER+ and ER- cells. *Mol Endocrinol*. Aug 1997;11(9):1319-1331.
 - 194.** Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, et al. ERalpha and AP-1 interact in vivo with a specific sequence of the F promoter of the human ERalpha gene in osteoblasts. *J Cell Physiol*. Jul 2008;216(1):101-110.

8 Anhang

Primer

Primer	Nachweis von	Sequenz [5' nach 3']	Fragmentlänge
ER56.F	ER α	TCCTGATGATTGGTCTCG	138 bp
ER56.R		ATGTAGCCAGCAGCATGT	
ESR- β F	ER β	GATCGCTAGAACACACCT	180 bp
ESR- β R		GCCTTACATCCTTCACAC	
β -Aktin FW (Q5)	β -Aktin	GTCTTCCCCTCCATCGTG	481 bp
β -Aktin RV (Q4)		TGAGGTAGTCAGTCAGGTCC	

Primer für die 5'-RACE

Primer	Sequenz [5' nach 3']
GeneRacer™ 5' Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
GeneRacer™ 5' Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
Control Primer B.1	GACCTGGCCGTCAGGCAGCTCG
RV1	CGCAGGGCAGAAGGCTCAGAAA
RV2	CTTGGATCTGATGCAGTAGGGC
RV3	GGCGTTGAACTCGTAGGCGGCG
RV4	AATCTTTCTCTGCCACCCTGGCG

Primer zum Nachweis der 5'-UTRs der unterschiedlichen Promotorvarianten des humanen ER α -Gens

Primer	Isoform	Sequenz [5' nach 3']	Fragmentlänge
ESR1-ProA/FW1	A	TAACCTCGGGCTGTGCTCT	591 bp
RV4		AATCTTTCTCTGCCACCCTGGCG	
ESR1-ProB/FW1	B	GGATCCGCTCTTCGCGTTT	218 bp
ESR1-ProB/RV1		GCTTTGGTGTGGAGGGTCA	
ESR1-ProC/FW1	C	CGGCCCTTGACTTCTACAA	162 bp
ESR1-ProC/RV1		AGATGCTTTGGTGTGGAGG	
ESR1-ProD/FW1	D	GGAGGAGCCAGATCAATCTT	148 bp
ESR1-ProD/RV1		CCAGATGCTTTGGTGTGGA	
ESR1-ProE/FW1	E	CAGAGAAATAATCGCAGAGC	909 bp
ESR1-ProE/RV1		CCTTGCAGCCCTCACAGGAC	
ESR1-ProF/FW1	F	AGCTCTTTAACGGGCTCGAA	320 bp
ESR1-ProF/RV1		GCTTTGGTGTGGAGGGTCA	

Allgemeine Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz [5' nach 3']
M13 FW	GTA AACGACGGCCAG
M13 RV	CAGGAAACAGCTATGAC

Primer zur Synthese der verschiedenen humanen ER α -Promotorkonstrukte in pGL2-basic

Die Erkennungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym ist unterstrichen dargestellt.

Promotor A		
Primer	Sequenz [5' nach 3']	Restriktionsenzym
hESR1-A-FW2	TAAT <u>ACGCGTTC</u> CTAGCCCAAGTGAACCG	<i>MluI</i>
hESR1-A-RV2	ATAACTCGAGATGCTTTGGTGTGGAGGG	<i>XhoI</i>
Sequenzierungsprimer	Sequenz [5' nach 3']	
hESR1-A-S-FW1	CTCAGAAGGTTGTGGAAGGG	
hESR1-A-S-RV1	TACTGGTCTCCCGAGCTCA	

Promotor B		
Primer	Sequenz [5' nach 3']	Restriktionsenzym
hESR1-B-FW2	CTTT <u>ACGCGICT</u> CTGTTGGGTGTTTGGGA	<i>MluI</i>
hESR1-B-RV2	ATTTCTCGAGTTGTCGTCGCTGCTGGA	<i>XhoI</i>
Sequenzierungsprimer	Sequenz [5' nach 3']	
hESR1-B-S-RV1	GCCAGGACCTCAGTTTCTT	
hESR1-B-S-RV2	GCTTTGGCAATTATGTTAC	
hESR1-B-S-RV3	CCTCAGGTCACGAACCAAG	

Promotor C		
Primer	Sequenz [5' nach 3']	Restriktionsenzym
hESR1-C-FW2	ATTT <u>ACGCGTGGC</u> ACCACTGTCAACCAACA	<i>MluI</i>
hESR1-C-RV2	TATACTCGAGCCCTGCTGGATCAAGAACG	<i>XhoI</i>
Sequenzierungsprimer	Sequenz [5' nach 3']	
hESR1-C-S-FW1	GATCCATGTGAACGCCACT	
hESR1-C-S-RV1	GAGAAACCCCAGCCCCTT	

Promotor F		
Primer	Sequenz [5' nach 3']	Restriktionsenzym
hESR1-F-FW-A1	TGGGACGCGTAAATGCTTACAGAACCCCC	<i>MluI</i>
hESR1-F-FW-C1	GGTCCATGCTCCTTCTCCTGCCATTCT	-
hESR1-F-RV-B1	AGAATGGGCAGGAGAAAGGAGCATGGACC	-
hESR1-F-RV-D1	AAACCTCGAGCCAGATGCTTTGGTGTGGAG	<i>XhoI</i>
hESR1-F-FW-A5	ATATA <u>CGCGIG</u> AGCGGGCTTTTGAG	<i>MluI</i>
hESR1-F-FW-A6	ATATA <u>CGCGIT</u> CTTACTTGGCAGGTG	<i>MluI</i>
hESR1-F-FW-A7	CGGGACGCGTAAATGTTTATCTTAGTGTT	<i>MluI</i>
hESR1-F-RV-G1	TGATCTCGAGTTCTGAGTCGGTAG	<i>XhoI</i>
hESR1-F-RV-G4	TTTTCTCGAGCTTGACTTCGGTAACCT	<i>XhoI</i>
hESR1-F-FW-A8	TATT <u>ACGCGIT</u> TGAGTTACTGCATTCC	<i>MluI</i>
Sequenzierungsprimer	Sequenz [5' nach 3']	
hESR1-F-S1-FW	AGGGCTGAAGAGTGTGAGAAGC	
hESR1-F-S1-RV	TCTTGACTTCGGTAACCTGCAG	
hESR1-F-S2-FW	AATGTTTATCTTAGTGTTAA	
hESR1-F-S2-RV	ATGCCATCCAGCCGATTTTCTC	
hESR1-F-S3-FW	GATTTTACAGCCCCTTTGC	

Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Die mutierten Basen sind in kleinen Buchstaben und fett gedruckt dargestellt.

Primer	Sequenz [5' nach 3']
hESR1-F-g484t_t489g-FW	GGCTTTTGAGTCCATGCCTGAGTAAtAAAG g CCCCAAAAAC ACT
hESR1-F-g484t_t489g-anti	AGTGTTTTTTGGG c TTT a TTACTCAGGCATGGACTCAAAA GCC
hESR1-F-a455c_g459a-FW	GGTAACAAGAAGTGCAG c GCG a GCTTTTGAGTCCATGCC
hESR1-F-a455c_g459a-anti	GGCATGGACTCAAAAG c TCGC g CTGCACTTCTTGTTACC
hESR1-F-t436g_g439a-FW	GTTACCGAAGTCAAGAACCTCATT a gCG a TAACAAGAAGT GCAGAG
hESR1-F-t436g_g439a-anti	CTCTGCACTTCTTGTT a TCG c TTAATGAGGTTCTTGACTTCG GTAAC
SMARCA3/a447g_a448t/M1-FW	CTCATTAAATCGGTAACAAG gt GTGCAGAGCGGGCTTTTGA
SMARCA3/a447g_a448t/M1-RV	TCAAAGCCCGCTCTGCAC ac CTTGTTACCGATTAATGAG

Oligonukleotide für EMSA

Name	Sequenz [5' nach 3']
hESR1-F-oligo-lang-WT(sense)	AACCTCATTAAATCGGTAACAAGAAGTGCAGAGCGGGCT
hESR1-F-oligo-lang-WT(anti)	AGCCCGCTCTGCACTTCTTGTTACCGATTAATGAGGTT

Oligonukleotide für die *self-primed* PCR

Die Oligonukleotide sind 5'-phosphoryliert (5'-P).

Name	Sequenz [5' nach 3']
5'-P-2x repeat hESR1-F-oligo-lang-WT(sense)	AACCTCATTAAATCGGTAACAAGAAGTGCAGAGCGGGCTAAC CTCATTAAATCGGTAACAAGAAGTGCAGAGCGGGCT
5'-P-2x repeat hESR1-F-oligo-lang-WT(anti)	AGCCCGCTCTGCACTTCTTGTTACCGATTAATGAGGTTAGC CCGCTCTGCACTTCTTGTTACCGATTAATGAGGTT

9 Publikationen

Publizierte Abstracts

- Mahmoodzadeh S, Fritschka S, Pregla R, Regitz-Zagrosek V. Klonierung und funktionelle Analyse der 5'- flankierenden Region des humanen kardialen Östrogenrezeptor-alpha Gens. *Zeitschrift für Kardiologie* 2005. 94 (Suppl 1): P1022.
- Fritschka S, Mahmoodzadeh S, Pregla R, Regitz-Zagrosek V. Identification of four different 5'-UTR variants of the ER α -gene in the human heart. *Hypertension* 2005. 46 (4): 903.
- Fritschka S, Mahmoodzadeh S, Regitz-Zagrosek V. Cloning and Functional Analysis of the 5'-UTR/Promoter Variants of the estrogen receptor alpha-Gene in the Human Heart. *Clinical Research in Cardiology* 2007. 96 (Suppl 1): P1513.
- Fritschka S, Mahmoodzadeh S, Regitz-Zagrosek V. Identification of inhibitory elements within the promoter region of the ER α gene in the human heart. *European Heart Journal* 2007. 28 (Abstract-Suppl): 427.

Originalarbeit

- Mahmoodzadeh S, Fritschka S, Dworatzek E, Pham H, Davidson MM, Regitz-Zagrosek V. Identification and functional analysis of estrogen receptor-alpha gene promoter in the human heart.
(in Vorbereitung)

10 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Schuster danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Frau Dr. S. Mahmoodzadeh möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit, für die zahlreichen Diskussionen und die Unterstützung bei vielen praktischen und theoretischen Fragen bedanken.

Besonders möchte ich mich auch bei E. Dworatzek und H. Pham für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die moralische Unterstützung bedanken.

S. Gillandt möchte ich für die wertvollen kritischen Anmerkungen bei der Gestaltung der Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die moralische Unterstützung. Für die unendliche Geduld und das Verständnis während all der Zeit möchte ich mich bei meiner Frau sehr herzlich danken.