

Aus dem Berliner Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zum Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Expression
extrazellulärer Matrixgene in Fibroblasten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elke Dworatzek

aus Zossen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D. N. Müller

Datum der Promotion: 20.04.2009

Meiner Familie & Aljoscha

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Rolle der extrazellulären Matrix während des kardialen Remodelings.....	1
1.1.1 Kardiale Fibroblasten	2
1.1.2 Kollagene.....	2
1.1.3 Matrix Metalloproteinasen	3
1.1.4 Matrix Metalloproteinase 2	4
1.2 Geschlechterspezifische Unterschiede während des kardialen Remodelings	5
1.3 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Expression extrazellulärer Matrixgene.....	6
1.4 Genomische und nicht-genomische Wirkung von 17 β -Estradiol	8
1.5 Ziel.....	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Laborgeräte	10
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3 Chemikalien.....	11
2.1.4 Primäre Antikörper	12
2.1.5 Sekundäre Antikörper.....	12
2.1.6 Medien und Zusätze.....	12
2.1.6.1 Medien für Bakterien.....	12
2.1.6.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	13
2.1.7 Tiere und Tierhaltung	13
2.1.8 Bakterienstämme	14
2.1.9 Zelllinien.....	14
2.1.10 Plasmide und humane MMP2-Promotor-Konstrukte.....	14
2.1.11 Oligonukleotide	15
2.1.11.1 Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion	15
2.1.11.2 Oligonukleotide für das Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	18

2.1.12	Kommerziell erworbene Kits.....	18
2.1.13	DNA-Längenstandards und Protein-Längenmarker.....	19
2.1.14	Verwendete Computerprogramme.....	19
2.1.15	Statistische Datenauswertung.....	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Zellkultur.....	20
2.2.1.1	Kultivierung.....	20
2.2.1.2	Kryokonservierung.....	21
2.2.1.3	Isolation kardialer Fibroblasten aus adulten Ratten.....	21
2.2.1.4	Behandlung der isolierten kardialen Fibroblasten mit 17 β -Estradiol.....	22
2.2.1.5	Transiente Transfektion.....	24
2.2.1.6	Stimulation transfizierter Zellen.....	24
2.2.1.7	Zellernte für die Luciferase-Reporter-Assays.....	25
2.2.1.8	Luciferase-Reporter-Assays.....	25
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.2.1	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	26
2.2.2.2	Herstellung von Glycerinkulturen.....	26
2.2.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	26
2.2.2.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	27
2.2.2.5	Sequenzierung.....	27
2.2.3	RNA-Analyse.....	27
2.2.3.1	Präparation von Gesamt-RNA.....	27
2.2.3.2	DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA.....	28
2.2.3.3	Qualitative und Quantitative Messung der isolierten RNA.....	28
2.2.3.4	Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	28
2.2.3.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.3.6	Quantitative Real-Time PCR.....	30
2.2.4	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	31
2.2.4.1	Zellcharakterisierung.....	31
2.2.4.2	Lokalisation von ER α und ER β	32
2.2.5	Proteinchemische Methoden.....	33
2.2.5.1	Präparation von Gesamtprotein.....	33

2.2.5.2	Präparation von Zellkernextrakt.....	34
2.2.5.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	35
2.2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.2.5.5	Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbung	36
2.2.5.6	Western Blot Analyse.....	36
2.2.5.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	37
2.2.6	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	38
2.2.6.1	Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden.....	39
2.2.6.2	EMSA und Super-Shift Analysen	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Charakterisierung der isolierten kardialen Fibroblasten.....	41
3.1.1	Morphologische Untersuchung der isolierten kardialen Fibroblasten.....	41
3.1.2	Immunhistochemische Untersuchung der isolierten kardialen Fibroblasten.....	42
3.1.3	Nachweis der Expression und Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von ER α und ER β	43
3.2	Einfluss von 17 β -Estradiol auf die mRNA-Expression in kardialen Fibroblasten	46
3.2.1	Regulation der mRNA-Expression von ER α und ER β durch 17 β -Estradiol.....	47
3.2.2	Einfluss von 17 β -Estradiol auf die mRNA-Expression extrazellulärer Matrixgene.....	50
3.2.2.1	Regulation der Kollagen I und III mRNA-Expression.....	51
3.2.2.2	Regulation der MMP2 und MMP9 mRNA-Expression.....	53
3.3	Einfluss von 17 β -Estradiol auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2- Promotors in HT1080-Zellen	55
3.3.1	Wirkung von 17 β -Estradiol auf die humane MMP2-Promotor-Aktivität	56
3.3.2	Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Aktivität des humanen MMP2-Promotors in Abhängigkeit der ER.....	58
3.4	Analyse und Identifikation cis- und trans-aktiver Elemente des humanen MMP2- Promotors	59
3.4.1	Computergestützte Analyse zur Identifikation putativer Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen	59

3.4.2	Identifikation bindender Transkriptionsfaktoren mittels EMSA und Super-Shift-Methode.....	60
3.4.2.1	Untersuchung putativer Bindungsstellen im Bereich von -342bp bis -266bp des humanen MMP2-Promotors	61
3.4.2.2	Analyse der putativen Elk-1 Bindungsstelle	64
3.4.2.3	Analyse zur Bindung des phosphorylierten Transkriptionsfaktors Elk-1	66
3.5	Analyse des 17 β -Estradiol Signaltransduktionsweges zur Inhibition der humanen MMP2-Promotor Aktivität	68
3.5.1	Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor Elk-1 in HT1080-Zellen.....	68
3.5.2	Phosphorylierung von Elk-1 über den MAP-Kinase Signalweg.....	70
3.5.3	Einfluss des MAP-Kinase Signalweges auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2-Promotors	71
3.6	Analyse der endogenen mRNA-Expression des humanen MMP2-Gens in HT1080-Zellen	72
4	Diskussion.....	74
4.1	Verifizierung der isolierten Fibroblasten aus adultem Rattenmyokard.....	74
4.2	Einfluss von 17 β -Estradiol auf die intrazelluläre Lokalisation und mRNA-Expression von ER α und ER β in kardialen Rattenfibroblasten.....	75
4.3	Geschlechterspezifische Regulation der mRNA-Expression von Kollagen I und III in kardialen Rattenfibroblasten durch 17 β -Estradiol.....	77
4.4	Reduktion der mRNA-Expression von MMP2 und MMP9 in kardialen Rattenfibroblasten durch 17 β -Estradiol	81
4.5	Inhibition der transkriptionellen Aktivität des humanen MMP2-Promotors in HT1080-Zellen durch 17 β -Estradiol	82
4.5.1	Bindung des Transkriptionsfaktors Elk-1 innerhalb des humanen MMP2-Promotors.....	84
4.5.2	Vermittlung der 17 β -Estradiol induzierten Reduktion der hMMP2-Promotor-Aktivität durch den MAP-Kinase Signalweg	85
4.6	Hypothetisches Modell zum Einfluss von 17 β -Estradiol auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2-Promotors	86

5 Zusammenfassung	89
Literaturverzeichnis.....	91
Abbildungsverzeichnis	107
Tabellenverzeichnis.....	109
Anhang	110

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
³² P	Radioaktiv markiertes Phosphor
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	lat. Aqua bidestillata / dt. bidestilliertes Wasser
AS	Aortenstenose
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	engl. fibroblast growth factor-basic / dt. basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
bp	engl. basepair / dt. Basenpaare
BSA	engl. bovine serumalbumin / dt. Rinderserumalbumin
c.s.	engl. charcoal stripped / dt. aktivkohlebehandelt
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	engl. complementary DNA / dt. komplementäre DNA
cfu	engl. colony forming units / dt. koloniebildende Einheiten
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	engl. counts per minute / dt. Anzahl pro Minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	17β-Estradiol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ER	engl. estrogen receptor(s) / dt. Östrogenrezeptor(en)
ERα	Östrogenrezeptor Alpha
ERβ	Östrogenrezeptor Beta

ERE	engl. estrogen responsive element / dt. Östrogen Responsives Element
ERK	engl. extracellular regulated kinase
et al.	lat. et alii / dt. und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
FW	engl. forward / dt. vorwärts
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
H ₂ O	Wasser
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hMMP2-Promotor	humaner MMP2-Promotor
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
ICI	ICI 182,780
IH	Immunofluoreszenzhistologie
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
Kol	Kollagen
KO	Knockout
LV	linker Ventrikel
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
M	Molarität, Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	engl. mitogen activated protein kinase
MEK	MAPK-Kinase
mer	Basenlänge
mg, µg, ng	Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgOAc	Magnesiumacetat
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten
ml, µl, nl	Milliliter, Mikroliter, Nanoliter
mM	millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinasen

MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid / dt. Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Proben
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
OD	Optische Dichte
OVX	ovarektomiert
p	Signifikanzniveau
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction / dt. Polymerase Kettenreaktion
PDTC	Pyrrolidin-Dithiocarbamat
pH	lat. potentia Hydrogenii
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prom	Promotor
p-Wert	<i>siehe „p“ – Signifikanzniveau</i>
r	Ratte(n)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RV	engl. reverse / dt. zurück
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SEM	engl. standard error of the mean / dt. Standardfehler des Mittelwertes
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBS-T	Tris Buffered saline-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktoren
U/min.	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht

UTR	engl. untranslated region / dt. nicht übersetzte Region
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	engl. volume per volume / dt. Volumen pro Volumen
VSMC	engl. vascular smooth muscle cell / dt. glatte Gefäßmuskelzellen
w/v	engl. weight per volume / dt. Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
xg	x-faches der mittleren Erdschwerebeschleunigung (g)

1 Einleitung

Die Größe, Form und Funktion des Herzens kann durch verschiedene Umbauprozesse, die unter dem Begriff des kardialen Remodeling zusammengefasst sind, verändert werden.¹ Einerseits handelt es sich dabei um einen physiologischen Prozess als Anpassung auf Wachstum, Ausdauertraining oder Altern,^{2,3} andererseits kann es eine pathologische Konsequenz sein, die durch eine externe Belastung hervorgerufen wird. Dazu gehören die chronische Druckbelastung des Herzens, wie zum Beispiel bei der arteriellen Hypertonie oder Aortenstenose (AS), eine Volumenbelastung bei Aorteninsuffizienz oder die mechanische Belastung durch einen Myokardinfarkt (MI).³⁻⁵ Das pathologische Remodeling beginnt mit einer Steigerung der Herzfunktion, im weiteren Verlauf verschlechtert sich die Funktion bis hin zum Herzversagen und plötzlichem Tod des Patienten.^{6,7} Die Belastung des Herzens führt zu einer Zunahme der Kardiomyozytengröße sowie zur Apoptose oder Nekrose einzelner Myozyten.⁸ Die kardialen Fibroblasten bestimmen die Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM) und sind damit entscheidend am kardialen Remodeling beteiligt.⁹ Dabei tragen die beschleunigten und abweichenden Umbauprozesse innerhalb der EZM hauptsächlich zum pathologischen Zustand des Herzens bei.¹⁰

1.1 Die Rolle der extrazellulären Matrix während des kardialen Remodelings

Die EZM bildet ein komplexes Geflecht aus Makromolekülen, das die Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten und Kapillaren umgibt und stabilisiert. Im gesunden Herzen ist die EZM für den Erhalt der strukturellen Integrität des Herzgewebes verantwortlich, indem sie maßgeblich an der Form und Funktion des Myokards beteiligt ist. Dabei dient sie nicht nur als Stützgewebe, sondern unterstützt auch die Migration, das Wachstum und die Differenzierung der im Myokard vorhandenen Zellen.¹¹ Die Hauptbestandteile der EZM sind die Kollagene des Typs I und III sowie kleinere Mengen an Kollagen IV, V und VI.¹² Weitere Komponenten sind Adhäsionsproteine, wie Fibronectin und Laminin, Anti-Adhäsionsproteine wie Osteopontin und Enzyme, die sogenannten Matrix Metalloproteinasen (MMPs), welche die Organisation und Komposition der EZM regulieren.¹³ Das dynamische Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der Matrixkomponenten ist für den Erhalt der EZM von maßgeblicher Bedeutung.¹⁴ Störungen dieses Gleichgewichtes, die während des kardialen Remodelings auftreten, bedingen eine Veränderung der Form und Funktion des Myokards.¹⁵

1.1.1 Kardiale Fibroblasten

Die kardialen Fibroblasten bilden mit 60% die Mehrheit der Zellen im Myokard und sind für die Aufrechterhaltung der EZM im gesunden Herzen verantwortlich.^{6, 16} Zu ihrer Hauptaufgabe gehört die Synthese der EZM-Proteine,¹² wie Kollagene des Typs I, III und IV, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und MMPs.¹⁶ Während des kardialen Remodelings differenzieren die kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten und exprimieren zusätzlich α -smooth muscle Aktin, wodurch sie in der Lage sind – ähnlich den glatten Muskelzellen – zu kontrahieren.⁶ Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Proliferation der kardialen Fibroblasten sowie zu einer erhöhten Synthese und Ablagerung der EZM-Proteine. Auf diese Weise tragen die kardialen Fibroblasten wesentlich zu den pathologischen Veränderungen des Herzens bei.¹⁷

1.1.2 Kollagene

Im menschlichen Herzen werden fünf verschiedene Kollagentypen exprimiert, wovon 90% des Gesamtkollagengehalts auf Typ I und III entfallen.² Beide Kollagentypen sind für den Erhalt der dreidimensionalen Struktur des Herzens verantwortlich. Sie beeinflussen die Spannung und Elastizität des Myokards während der Kontraktions- (Systole) und Entspannungsphase (Diastole).¹³ Kollagen I ist mit ungefähr 80% Anteil im Myokard vertreten, besitzt durch seine dicken Fasern eine hohe Zugfestigkeit und trägt hauptsächlich zur Stabilität des Herzgewebes bei. Dagegen ist Kollagen III mit nur ungefähr 10% vertreten, bildet ein lockeres Netzwerk aus dünnen Fasern und gewährleistet die Elastizität des Myokards.¹⁸ Die Kollagene IV, V und VI bilden die restlichen 10% des Kollagengehalts.² Alle drei Kollagentypen sind an der Basalmembran lokalisiert und ermöglichen durch ihre sehr feinen Fasern die Interaktion mit Membran-Rezeptoren, wie zum Beispiel Integrin.¹⁹

Kollagene sind sehr stabile Proteine. Die Rate der Kollagensynthese und -degradation erfolgen im gesunden Herzen sehr langsam und befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht.²⁰ Während des kardialen Remodelings kommt es zu einer Zunahme des Kollagengehalts innerhalb des Myokards. Eine erhöhte Ablagerung von Kollagen I und III sowie ein verändertes Verhältnis zueinander kann die systolische und diastolische Funktion des Herzens beeinträchtigen.²¹ Zusätzlich verhindert eine erhöhte Kollagenablagerung den Kontakt der kardialen Myozyten untereinander und stört damit die elektrische Erregung innerhalb der Systole.⁸ Des Weiteren kommt es zu einer gestörten Sauerstoff-Diffusion sowie einer reduzierten Kapillardichte, gefolgt von einer Hypoxie der Myozyten.¹² Ein Überschuss an Kollagen resultiert aus einer erhöhten Kolla-

gensynthese oder durch eine reduzierte, bzw. fehlende Degradation der Kollagene durch die MMPs.⁴

1.1.3 Matrix Metalloproteinasen

Bei den MMPs handelt es sich um eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die eine wichtige Rolle bei den Umbau- und Abbauprozessen der EZM im physiologischen und pathologischen Zustand des Herzens einnehmen.²² Sie besitzen die Fähigkeit ein breites Spektrum der EZM-Proteine zu degradieren und sind als einzige Enzyme in der Lage, die durch eine außerordentlich hohe proteolytische Resistenz gekennzeichneten fibrillären Kollagene zu spalten.²³ Derzeit sind 25 Mitglieder der MMP-Familie bekannt, die aufgrund ihrer Struktur und Substratspezifität in fünf Gruppen eingeteilt werden können.²⁴ Hierzu gehören die Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membrangebundenen MMPs und andere MMPs.²⁵

Zu den Vertretern der Kollagenasen gehören MMP1, MMP8 und MMP13. Sie spalten die fibrillären Kollagene des Typs I, II und III.²⁶ Die entstehenden denaturierten Kollagene (Gelatine) werden durch die Gelatinasen MMP2 (Gelatinase A) und MMP9 (Gelatinase B) abgebaut.²⁷ Des Weiteren können die Gelatinasen Kollagen IV und Laminin, welche die Stabilität der Basalmembran gewährleisten, spalten. Darüber hinaus besitzt MMP2 die Fähigkeit, die Degradation von Kollagen I und III zu initiieren und durchzuführen.²⁸⁻³¹ Eine weitere Gruppe der MMPs sind die Stromelysine, zu denen MMP3, MMP7, MMP10 und MMP11 gehören. Sie bauen die Proteoglykane, Laminin und Fibronectin der EZM ab.³² Die Vertreter der membrangebundenen MMPs, wie zum Beispiel MMP14, bauen unterschiedliche Komponenten der EZM ab und tragen zur Aktivierung anderer MMPs bei.³³ Bereits identifizierte aber noch wenig erforschte MMPs, wie zum Beispiel MMP12 und MMP20, können noch keiner dieser Gruppen zugeordnet werden und bilden die Gruppe der „anderen MMPs“.²⁴

Eine präzise Regulation der MMP-Synthese und -Aktivität ist von eminenter Bedeutung für den Erhalt der Struktur und Funktion des kardiovaskulären Gewebes.³⁴ Hierbei sind eine Vielzahl von Mechanismen bekannt, welche die Expression und Aktivierung der MMPs regulieren. Zu den drei wichtigsten Regulationsmechanismen gehört die Regulation auf transkriptioneller Ebene, die Aktivierung latenter MMPs sowie die Inhibierung der MMPs durch die sogenannten Tissue Inhibitor der Metalloproteinasen gehört.³⁵ Während des kardialen Remodelings stellen die MMPs die treibende Kraft dar,³² wobei in verschiedenen Herzerkrankungen eine erhöhte oder reduzierte mRNA-, Proteinexpression und Enzymaktivität der MMPs beobachtet werden kann-

te.³⁶ Eine reduzierte MMP-Aktivität führt zu einer verstärkten Kollagenablagerung und somit eingeschränkter Elastizität des Myokards. Dagegen hat eine gesteigerte Aktivität der MMPs einen verstärkten Abbau der Kollagene zur Folge. Daraus resultiert die Überdehnung der Myokardwand, eine sogenannte Dilatation, und es besteht die Gefahr der Ruptur des Herzens mit anschließendem Herzversagen.²⁵

1.1.4 Matrix Metalloproteinase 2

Das Enzym MMP2, oftmals auch als Gelatinase A, 72-kD Gelatinase oder Typ IV Kollagenase bezeichnet,³⁷ wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert und wurde in den Myozyten, Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) des Myokards nachgewiesen.³⁸ Hauptsächlich und konstitutiv wird MMP2 jedoch in den kardialen Fibroblasten exprimiert.³⁹ Eine Reihe unabhängiger klinischer und tierexperimenteller Studien zeigten eine signifikante Erhöhung der mRNA- und Proteinexpression sowie eine Steigerung der MMP2-Aktivität im Zusammenhang mit den kardialen Umbauprozessen der EZM in diversen Herzerkrankungen.⁴⁰⁻⁴⁴ Eine erhöhte MMP2-Expression und -Aktivität wirkt dabei einer erhöhten Synthese und Ablagerung der EZM-Komponenten im Myokard entgegen. Bislang ist unklar, ob die zunehmende Synthese und Aktivität in direkter Verbindung mit einer gesteigerten Kollagendegradation steht oder ob es sich um einen erfolglosen Kompensationsmechanismus handelt, der eine erhöhte Kollagenablagerung nicht verhindern kann.⁴⁵ Eine Analyse an Knockout (KO)-Mäusen mit deletiertem MMP2-Gen ermöglichte es, Hinweise zum Einfluss von MMP2 während der strukturellen und funktionellen Veränderungen des Myokards während des kardialen Remodelings zu erhalten. Diese Studie zeigte eine Reduktion der linksventrikulären Wanddicke und -Masse sowie eine geringere Kollagenablagerung gegenüber den Kontrolltieren ohne MMP2-Gendeletion nach induzierter AS.⁴⁶ Eine weitere Untersuchung an MMP2-transgenen Mäusen zeigte, dass die Überexpression von MMP2 ohne weitere Manipulationen bereits ein Remodeling der kardialen EZM mit einer erhöhten Kollagenablagerung im linken Ventrikel (LV) des Herzens auslöste.⁴⁷ Die Autoren schlussfolgerten, dass MMP2 das kardiale Remodeling begünstigt und paradoxerweise zu einer erhöhten Kollagenablagerung im LV beiträgt.

Das kardiale Remodeling der EZM bewirkt eine rasche Veränderung der Genexpression aller beteiligten Matrix-Komponenten.⁸ Somit stellt die Regulation auf transkriptioneller Ebene einen wichtigen Mechanismus in der veränderten MMP2-Synthese dar. Noch vor einiger Zeit wurde angenommen, dass MMP2 nur post-transkriptionell reguliert werden kann.⁴⁸ Der derzeitige Kenntnisstand deutet, insbesondere nach der Identifizierung mehrerer putativer transkriptioneller

Elemente, darauf hin, dass die Regulation der MMP2-Expression hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene stattfindet.^{36, 48-50} Bis heute ist die transkriptionelle Regulation des MMP2-Gens noch nicht im Detail aufgeklärt. Auffällig ist, dass die 5'-flankierende Region des MMP2-Gens nur wenige Gemeinsamkeiten mit den Promotoren der anderen Mitglieder der MMP-Familie zeigt.³⁷ Die Promotorsequenz des MMP2-Gens besitzt keine TATA- oder CAAT-Box,⁵¹ die wichtige essentielle regulatorische Elemente für die Transkription eines Gens darstellen.⁵² Dafür wurden zwei GC-Boxen innerhalb der proximalen Promotorregion identifiziert, an welche die Transkriptionsfaktoren (TF) Sp1, Sp3 und AP-2 binden und für die konstitutive Expression des humanen MMP2-Gens (hMMP2-Gen) in Astroglioma Zellen verantwortlich sind.⁵³ Weiter stromaufwärts gelegen konnte eine *Enhancer*- sowie eine *Silencer*-Region innerhalb des hMMP2-Promotors lokalisiert werden.⁵⁴ Mit Hilfe von *Super-Shift*-Assays konnte die Bindung des TF AP-2 innerhalb der *Enhancer*-Region nachgewiesen werden.⁵⁵ Bian *et al.* konnten die Bindung von AP-2 innerhalb der gleichen Region des hMMP2-Promotors jedoch nicht bestätigen. Es gelang ihnen, die spezifische Bindung des TF p53 innerhalb der *Enhancer*-Region in humanen Fibrosarkom-, Knochenmark- und embryonalen Nierenzellen nachzuweisen.⁵⁶ Taki *et al.* zeigten in Epithelkarzinomzellen eine Bindung des TF Ets-1 innerhalb dieses Bereiches.⁵⁷ Diese und weitere Untersuchungen demonstrieren die Vielfältigkeit und Komplexität der transkriptionellen Regulation des MMP2-Gens in Abhängigkeit des Zelltyps.⁵⁸⁻⁶² In Übereinstimmung mit der im hMMP2-Promotor identifizierten *Enhancer*-Region, konnte innerhalb der Promotorregion des Ratten MMP2-Gens ein analoges *Enhancer*-Element identifiziert werden.⁵¹ Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass die Sequenz des *Enhancer*-Elements homolog zur Sequenz innerhalb des hMMP2-Promotors ist und die Fähigkeit besitzt die TF AP-2, p53 und Ets-1 zu binden.⁶³⁻⁶⁵ Weiterhin befindet sich innerhalb der Promotorsequenz eine regulatorische GATA-2 Bindungsstelle, die ebenfalls eine hohe strukturelle Übereinstimmung zwischen dem MMP2-Gen der Ratte und des Menschen aufweist.⁶⁶ Diese Daten zeigen, dass wesentliche regulatorische Elemente des MMP2-Promotors homolog zwischen beiden Spezies vorliegen.

1.2 Geschlechterspezifische Unterschiede während des kardialen Remodelings

Zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien zeigten signifikante geschlechterspezifische Unterschiede während des kardialen Remodelings nach einem MI, bei der AS, der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) und Herzinsuffizienz.⁶⁷⁻⁷² Weibliche Patienten entwickeln nach Druckbelastung des Myokards – zum Beispiel bei einer AS – gegenüber männlichen Patienten eine geringere myokardiale Hypertrophie und haben eine bessere linksventrikuläre

re Herzfunktion.⁷³ Einige klinische Studien liefern Hinweise darauf, dass die kardialen Umbauprozesse der EZM in den Herzen beider Geschlechter unterschiedlich und somit teilweise für beobachtete geschlechterabhängige Unterschiede in der Herzfunktion verantwortlich sind. Villari *et al.* konnten in Patienten mit AS eine signifikant höhere Kollagenablagerung in den männlichen Herzen als in den weiblichen Herzen zeigen.⁷⁴ Untersuchungen an Patienten mit einer LVH, die durch eine hypertrophe Kardiomyopathie hervorgerufen wurde, zeigten, dass die Herzen der männlichen Patienten eine stärkere Verdickung der LV-Wand⁷⁵ sowie einen weitaus höheren Kollagengehalt gegenüber den weiblichen Patienten aufwiesen.⁷⁶

Tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten und Mäusen bestätigten die in der Klinik beobachteten geschlechterspezifischen Unterschiede in der Morphologie des Herzens während des kardialen Remodelings. Dabei konnte nach einer induzierten AS oder einem MI eine stärkere Zunahme der linksventrikulären Wanddicke,⁷⁷⁻⁸⁰ eine stärkere Kollagenablagerung^{81, 82} sowie eine signifikant höhere MMP2-Aktivität in den Herzen der männlichen Tiere gegenüber denen der Weibchen beobachtet werden.⁸³ Die Autoren gehen von einem geschlechterabhängigen Unterschied im kardialen Umbauprozess der EZM aus, der zu einem besseren Erhalt der Morphologie sowie zu einer besseren Funktion des weiblichen Herzens beiträgt. Hinweise darauf, dass das Sexualhormon 17 β -Estradiol (E2) dabei eine regulatorische Rolle einnimmt, lieferten Untersuchungen mit ovariectomierten (OVX) Tieren. Die Ovariectomie an Ratten führte zur verstärkten Ablagerung von Kollagen I sowie zu einer Abnahme der Proteinexpression von Kollagen III und MMP2-Aktivität. Eine Behandlung der Tiere mit E2 reduzierte die Kollagen I-Ablagerung und erhöhte die Kollagen III Proteinexpression sowie die Pro-MMP2-Aktivität.⁸⁴ Induzierte man den OVX Ratten einen MI verschlechterte sich die Herzfunktion gegenüber den Kontrolltieren ohne OVX.⁸⁵ Eine E2-Substitution in OVX Mäusen führte jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Kollagenablagerungen sowie zu einer verbesserten Herzfunktion gegenüber den Tieren ohne E2-Gabe.^{86, 87}

Die dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen weisen darauf hin, dass E2 einen Effekt auf die kardialen Umbauprozesse der EZM während des Remodelings über die Regulation der extrazellulären Matrixkomponente ausübt.

1.3 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Expression extrazellulärer Matrixgene

Untersuchungen zum Einfluss von E2 auf die Expression extrazellulärer Matrixgene zeigten sowohl eine Erhöhung als auch eine Reduktion der mRNA- und Proteinexpression in Abhängig-

keit des untersuchten Zell- und Gewebetyps. So zeigten isolierte Osteoblasten von Ratten,⁸⁸ humane Hautfibroblasten,⁸⁹ humane Fibroblasten aus dem Kniegelenk⁹⁰ und aus der Leistengegend⁹¹ eine erhöhte mRNA- sowie Proteinexpression von Kollagen I und III nach E2-Behandlung. Dagegen reduzierte E2 die mRNA-Expression von Kollagen I und III in isolierten bovinen glatten Muskelzellen⁹² und isolierten Mesangialzellen von Mäusen und Ratten.⁹³⁻⁹⁵ Silbiger *et al.* zeigten in Mesangialzellen, neben der reduzierenden Wirkung von E2 auf die Kollagen I mRNA-Expression, eine erhöhte AP-1 Proteinexpression sowie eine verstärkte Bindung des TF an seine Konsensussequenz. Die Autoren spekulierten, dass E2 die reduzierende Wirkung auf die Kollagen I mRNA-Expression über den TF AP-1 vermittelt.⁹⁴

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Wirkung von E2 auf die mRNA- und Proteinexpression von MMP2 und MMP9. Isolierte Fibroblasten des Beckenbodens einer postmenopausalen Frau, eine humane Prostatakrebs- und Epithelzelllinie zeigten nach der Behandlung mit E2 eine signifikante Inhibition der Expression von MMP2 und MMP9 auf mRNA- und Proteinebene.⁹⁶⁻⁹⁸ Eine signifikante Reduktion der Expression von MMP2 und MMP9 durch E2 konnte in humanen MCF-7 Zellen beobachtet werden.⁹⁹ In isolierten Mesangialzellen von Mäusen zweier verschiedener Stämme zeigten die Zellen des einen Stammes eine Reduktion der MMP9 mRNA-Expression nach E2-Behandlung. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression durch E2 in den Zellen des anderen Stammes erhöht.^{100, 101} Diese Studie verdeutlichte erneut die zellspezifische Regulation durch E2. Die Autoren vermuten, dass der stimulierende Effekt auf die Interaktion der Östrogenrezeptoren (ER) mit AP-1 und NF- κ B zurückzuführen ist.¹⁰⁰ Guccione *et al.* wiesen in isolierten Maus-Mesangialzellen ebenfalls eine stimulierende Wirkung von E2 auf die MMP2-Proteinexpression nach.¹⁰² Die Autoren demonstrierten eine erhöhte AP-2-Proteinexpression und als Folge davon eine stärkere Bindungseffizienz von AP-2 an seine Konsensussequenz durch die Behandlung mit E2. Wingrove *et al.* zeigten in kultivierten humanen VSMC eine Erhöhung der MMP2-Proteinexpression nach der Behandlung mit E2, die durch die Zugabe der E2-Antagonisten Tamoxifen und ICI aufgehoben wurde.¹⁰³ Die Autoren vermuten eine Wirkung der ER als Transkriptionsfaktoren. Ein vorhandenes halbpalindromisches *Estrogen Responsive Element* (ERE) innerhalb des MMP2-Promotors unterstützt diese Annahme zusätzlich.¹⁰⁴ Marin-Castano *et al.* spekulierten dagegen, dass ein beobachteter Anstieg der MMP2-Proteinexpression in humanen Epithelzellen durch den TF NF- κ B vermittelt wird.¹⁰⁵

Die hier dargestellten Untersuchungen demonstrieren eine zell- und gewebespezifische Regulation der Expression extrazellulärer Matrixgene durch E2. Die spezifischen Mechanismen, über

die E2 seine regulatorische Wirkung auf die Matrixgene ausübt, sind bislang weitgehend ungeklärt.

1.4 Genomische und nicht-genomische Wirkung von 17 β -Estradiol

Östrogene, deren aktivste Form E2 ist, gehören zur Familie der lipophilen Steroidhormone. Dabei vermittelt E2 seine Wirkung hauptsächlich durch die Bindung an seine spezifischen Rezeptoren ER alpha (ER α) und ER beta (ER β). Beide Rezeptoren gehören zu der Familie der Steroidrezeptoren und werden von zwei verschiedenen Genen kodiert.¹⁰⁶ Im menschlichen Herzen werden beide ER in den Myozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und VSMC exprimiert.¹⁰⁷ Wie alle Mitglieder der nukleären Hormonrezeptor-Superfamilie, können die ER als ligandeninduzierte TF agieren. Nach der Aktivierung lagern sich die Rezeptoren zu Homo- oder Heterodimeren zusammen, die durch die Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen die Regulation zahlreicher Zielgene modulieren können.¹⁰⁸ E2 kann auf dem genomischen Weg durch die direkte Bindung der ER an das ERE¹⁰⁹ oder durch die Interaktion mit anderen DNA-gebundenen TF, wie AP-1, Sp1, NF- κ B und GATA wirken.¹¹⁰ Weiterhin ist neben dem genomischen Weg für E2 die Wirkung über den nicht-genomischen Weg beschrieben. Dabei bindet E2 an die zytoplasmatischen ER, die darauf hin mit anderen Proteinen interagieren und gemeinsam verschiedene zytoplasmatische Signalkaskaden aktivieren können.¹¹¹ Klassischerweise wird die nicht-genomische Wirkung von E2 mit einem schnellen und nicht-transkriptionellen Effekt des Steroidhormons in Verbindung gebracht.¹¹² Neue Erkenntnisse über die Komplexität der E2-Wirkung legen nahe, dass die losgelöste Betrachtung des genomischen und nicht-genomischen Weges nicht mehr zeitgemäß ist. Beide Wege sind anscheinend untrennbar miteinander verbunden und in der Lage sich gegenseitig zu beeinflussen.¹¹³

1.5 Ziel

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Sexualhormons E2 auf die mRNA-Expression extrazellulärer Matrixgene in Fibroblasten zu analysieren. Hierbei sollten Untersuchungen in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen gesunden Ratten Aufschluss darüber geben, wie die mRNA-Expression von Kollagen I und III sowie von MMP2 und MMP9 durch E2 reguliert wird und ob deren Regulation geschlechterabhängige Unterschiede aufweist. Da E2 seine Wirkung hauptsächlich über ER α und ER β vermittelt, sollte in diesem Zusammenhang die Regulation der mRNA-Expression beider ER durch E2 analysiert werden. Ein weiteres Ziel die-

ser Arbeit war die Analyse des Einflusses von E2 auf die transkriptionelle Regulation des hMMP2-Gens in Fibroblasten. Dabei sollte untersucht werden, welchen Einfluss E2 auf die Promotor-Aktivität des hMMP2 hat, und welche cis- und trans-aktiven Elemente innerhalb der Promotorsequenz bei der E2 vermittelten Regulation eine Rolle spielen. Außerdem sollten die an der E2-abhängigen hMMP2-Promotor-Regulation beteiligten TF identifiziert und näher analysiert werden über welchen Signaltransduktionsweg E2 seine Wirkung ausübt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im folgenden Kapitel sind die Bezugsquellen der wesentlichen Materialien, die zur Durchführung der dargestellten Methoden notwendig waren, aufgelistet.

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Geräte	Bezeichnung	Firma
Bioanalyzer	<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies
Bodenzentrifuge	<i>Heraeus Sepatech</i>	Heraeus von Kendro
CO ₂ -Inkubator	<i>Heracell 150</i>	Heraeus von Kendro
ELISA-Messgerät	<i>Benchmark Plus</i>	BIO-RAD
Fluoreszenzmikroskop	<i>CTRMIC, DMIREZ</i>	Leica
Konfokal-Mikroskop	<i>Leica DM 2500</i>	Leica
Luminometer	<i>1420 Multilabel Counter Victor³™</i>	Perkin Elmer
Mikroskop	<i>Axiovert 25</i>	Carl Zeiss
Gradientencycler	<i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf
Scanner	<i>Storm860</i>	Molekular Diagnostik
Sterilbank	<i>Holten Lamin Air</i>	Jonan Nordic
Szintillationszähler	<i>1450 LSC&Luminescence Counter MicroBeta TriLux</i>	Perkin Elmer
TAQ-Man	<i>ABI 7000</i>	Applied Biosystems
Tischzentrifuge	<i>Mikro 22 R</i>	Hettich
Ultrazentrifuge	<i>Opti Max Ultrazentrifuge</i>	Beckmann
UV-VIS-Spektrophotometer	<i>Genesys 6</i>	Thermo Spectronic
Zentrifuge	<i>Megafuge 1.0 R</i>	Kendro

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Materialien		Firma
Reaktionsgefäße	<i>1,5ml; 2ml</i>	Eppendorf
Zell-Kulturschalen	<i>10cm Durchmesser</i>	Biochrom
6-Loch-Zellkulturplatten	<i>3,5cm Durchmesser</i>	Biochrom
12-Loch-Zellkulturplatten	<i>2,5cm Durchmesser</i>	Biochrom
8-Kammer-Objektträger		BD Bioscience
Zentrifugenröhrchen	<i>15ml; 50ml</i>	Biochrom
96-Loch-Platten	<i>Luciferase Messung</i>	Greiner BioOne
Kryo-Röhrchen	<i>2ml</i>	Corning Incorporated
Corex-Röhrchen	<i>30ml</i>	Corex
illustra™Micro Spin™ G-25 Columns		GE Healthcare Life Science

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Laborchemikalien haben den Reinheitsgrad „pro Analysis“ und wurden – soweit nicht anders angegeben – von den Firmen Invitrogen (USA), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), BIOZOL Diagnostica GmbH (Echingen) und Fluca (Buchs) bezogen.

2.1.4 Primäre Antikörper

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper. (WB: Western Blot, EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay, IH: Immunofluoreszenzhistologie)

Antikörper	Nummer	Spezies	Firma	Anwendung
Anti-TFIID	sc-204	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz	WB
Anti-Calpain-1/2	208730	Maus monoklonal	Calbiochem	WB
Anti-Elk-1	sc-355 X	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz	WB, EMSA
Anti-p-Elk-1	sc-8406 X	Maus monoklonal	Santa Cruz	WB, EMSA
Anti-Sp1	PEP2 X	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz	EMSA
Anti-ER α (MC-20)	sc-542 X	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz	EMSA, IH
Anti-ER α (F-10)	sc-8002 X	Maus monoklonal	Santa Cruz	EMSA
Anti-ER β	PA1-310B	Kaninchen polyklonal	Thermo Science	IH
Anti-Vimentin	IF01	Maus monoklonal	Onkogene	IH
Anti-Von Willebrand Faktor	A 0082	Kaninchen polyklonal	Dako	IH
GAPDH	MAB374	Maus monoklonal	Chemicon	WB

2.1.5 Sekundäre Antikörper

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper. (WB: Western Blot, IH: Immunofluoreszenzhistologie)

Antikörper	Nummer	Firma	Anwendung
Ziege-anti-Kaninchen, FITC-gekoppelt	111-095-045	Dianova	IH
Ziege-anti-Maus, Cy3-gekoppelt	115-166-003	Dianova	IH
Esel-anti-Maus, HRP-gekoppelt	715-035-150	Dianova	WB
Esel-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	711-035-152	Dianova	WB

2.1.6 Medien und Zusätze

2.1.6.1 Medien für Bakterien

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Medien für Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB-Flüssigmedium	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l NaCl; pH 7,2 15min bei 121°C autoklaviert

2.1.6.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bezeichnung		Hersteller
Charcoal-Stripped (c.s.) FKS		Biochrom
DulbeccosModifiedEaglesMedium (DMEM) mit und ohne Phenolrot	<i>1x High Glucose (4500mg/ml Glucose)</i>	PAA Laboratories GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Carl Roth GmbH
Fetales Kälberserum (FKS)		PAA Laboratories GmbH
Fibroblast Growth Factor-Basic (bFGF)		Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	<i>(1M)</i>	PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin		PAA Laboratories GmbH
Phosphat Buffered Saline (PBS)		PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	<i>100x (10.000 Units/ml; 10mg/ml; 29,2mg/ml)</i>	PAA Laboratories GmbH
Trypsin/EDTA mit Phenolrot	<i>0,25%; 1mM EDTA</i>	GIBCO
Trypsin/EDTA ohne Phenolrot	<i>0,05%; 1mM EDTA</i>	GIBCO

2.1.7 Tiere und Tierhaltung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten kardialen Fibroblasten wurden aus dem Myokard weiblicher und männlicher Wistar Ratten isoliert. Das Alter der verwendeten Tiere lag zwischen neun und elf Wochen. Die Tiere wurden bei der Firma Harlan Winkelmann erworben und unter den tiermedizinischen Standards im Tierstall des *Center for Cardiovascular Research (CCR)* gehalten. Die Durchführung des Versuches wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt (Tierversuchsnummer: O 0042/03).

Der Nachweis darüber, dass es sich bei den verwendeten isolierten Rattenherzen um gesundes Myokardgewebe handelt, wurde von Dr. med. Jonas Busch im Rahmen seiner Dissertation „*Endothelzell-Differenzierungs-Gen-Rezeptoren bei Fibroseprozessen in Herz (EDG-1) und Niere (EDG-2)*“ mittels Hämatoxylin-Eosin- und *Periodic acid-Schiff*-Färbung erbracht.

2.1.8 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue ultrakompetente Zellen

Bei diesem Bakterienstamm handelt es sich um ultrakompetente Zellen der Firma Stratagene. Ihre Transformationseffizienz liegt bei 5×10^9 cfu/ μ g DNA. Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]*

2.1.9 Zelllinien

Die HT1080-Zellen (humane Fibrosarkomzellen) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ-Nummer: ACC 315) bezogen. Die MCF-7 Zellen (humane Mammakarzinomzellen) wurden von der Firma *Cell Lines Service* (CLS), Deutschland bezogen. Die V236-Zellen (humane Endothelzellen) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Theuring, CCR, Campus Mitte, Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Plasmide und humane MMP2-Promotor-Konstrukte

Tabelle (Tab.) 7 stellt die zur Transfektion verwendeten Plasmide tabellarisch dar.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Größe	Hersteller
phRL-TK (Renilla-Plasmid)	4000bp	Promega
hESR1-pSG5	5900bp	Gabe von Prof. Dr. P. Chambon
pSG5	4100bp	Stratagene
pS2-pGL3	6100bp	Gabe von Prof. Dr. G. Schönfelder
pGL3-Basic	4800bp	Promega
pGL2-Basic	5600bp	Promega

Die in der Transfektion verwendeten hMMP2-Promotor-Konstrukte (hMMP2-Prom-Konstrukte) sind mit ihrer Bezeichnung und enthaltenem Sequenzabschnitt des hMMP2-Promotors in Tab. 8 aufgelistet (der Translationsstart wurde als +1bp definiert). Die Expressionskonstrukte hMMP2-417-, -708-, -957- und -1168-pGL2 wurden im Rahmen der Diplomarbeit „Klonierung und Identifizierung der positiven und negativen regulatorischen Regionen des Promotors des humanen Matrix Metalloproteinase 2 Gens (MMP2)“ von der Autorin dieser Arbeit selbst hergestellt. Die

Konstrukte hMMP2-708/k- und -324-pGL2 wurden von Dr. S. Mahmoodzadeh (Arbeitsgruppe Prof. Regitz-Zagrosek) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 8: Verwendete humane MMP2-Promotor-Konstrukte. Dargestellt ist die Bezeichnung der Expressionskonstrukte hMMP2-pGL2 sowie der Sequenzabschnitt des hMMP2 Promotors, den das Konstrukt umfasst (relativ zum Translationsstart +1bp).

Bezeichnung	Sequenzabschnitt (relativ zum Translationsstart, +1bp)
hMMP2-324-pGL2	-324bp bis +17bp
hMMP2-417-pGL2	-417bp bis +17bp
hMMP2-708-pGL2	-685bp bis +17bp
hMMP2-708/k-pGL2	-685bp bis -260bp
hMMP2-957-pGL2	-960bp bis +17bp
hMMP2-1168-pGL2	-1174bp bis +17bp

2.1.11 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erfolgte durch die Firmen BioTeZ Berlin-Buch GmbH und Thermo Electron GmbH. Sie wurden auf eine Konzentration von 50pmol/µl verdünnt. Die Oligonukleotide und die Sonde zur Detektion des Ratten (r) ERβ-Gens wurde von der Firma TIB Molbiol Berlin bezogen und auf eine Konzentration von 20pmol/µl verdünnt. Die HPLC-gereinigten Oligonukleotide für die EMSA-Experimente wurden über die Firma Services in Molecular Biology (SMB) bestellt und auf eine Konzentration von 100pmol/µl verdünnt.

2.1.11.1 Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion

Bei der Auswahl der Oligonukleotide (Primer) für die PCR sowie Real-Time PCR wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare intronüberspannend liegen. Die zur Konstruktion der Primer benötigten Gensequenzen wurden von der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezogen. Eine zusätzliche Überprüfung der Spezifität der konstruierten Primer wurde mit Hilfe eines *BLAST-Searchs* auf dem Server von NCBI durchgeführt werden. Um die Amplifikate auf ihre richtige Größe zu überprüfen, wurden sie auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (Kapitel 2.2.2.4) und zusätzlich über eine Sequenzierung auf die korrekte Sequenz überprüft (Kapitel 2.2.2.5). Das Sondensystem zur Detek-

tion des rER α -Gens in der Real-Time PCR wurde von der Firma Applied Biosystems (ABI) mit der Assay-ID: Rn01640372_m1 bezogen.

In Tab. 9 sind die verwendeten genspezifischen Ratten-Primer für die Real-Time PCR mit ihrer Bezeichnung, ihrer Sequenz und der jeweiligen Orientierung in *Sense* (FW)- und *Antisense* (RV)-Richtung, Primerlänge, Primerverhältnis und Größe des Amplikons dargestellt. Die Annealingtemperatur der Primer beträgt 60°C.

Tabelle 9: Übersicht der genspezifischen Ratten-Primer für die Real-Time PCR. Neben der Bezeichnung in Spalte eins ist die Sequenz der Primer mit der Orientierung in Spalte zwei dargestellt. Spalte drei zeigt die Länge der Primer, in Spalte vier ist das Primerverhältnis dargestellt und Spalte fünf zeigt die Größe des Amplikons.

Name	Sequenz (5' nach 3')	Länge	Primerverhältnis (FW:RV)	Größe
HPRT	FW: GTC CCA GCG TCG TGA TTA GT	20mer	5pmol:15pmol	141bp
	RV: CTC GAG CAA GTC TTT CAG TCC	21mer		
ER β	FW: GAA GTA GGA ATG GTC AAG TGT GGA TC	26mer	5pmol:5pmol	175bp
	RV: CCA GTT GCT CTG GAC TCA AGG T	22mer		
	Sonde: FAM-TGC ACC CCG GGT GAA GGA GCT AC XT p			
Kol I	FW: GCC AAG AAG ACA TCC CTG AA	20mer	5pmol:5pmol	201bp
	RV: CTT CTG GGC AGA AAG GAC AG	20mer		
Kol III	FW: GAA AAA ACC CTG CTC GGA ATT	21mer	5pmol:5pmol	78bp
	RV: GGA TCA ACC CAG TAT TCT CCA CTC T	25mer		
MMP2	FW: TAC GAT GAT GAC CGG AAG TG	20mer	15pmol:15pmol	153bp
	RV: GGA AGT TCT TGG TGT AGG TG	20mer		
MMP9	FW: CCT CTG CAT GAA GAC GAC ATA A	22mer	15pmol:15pmol	64bp
	RV: GGT CAG GTT TAG AGC CAC GA	20mer		

In Tab. 10 sind die verwendeten genspezifischen Ratten-Primer für die PCR mit ihrer Bezeichnung, ihrer Sequenz und der jeweiligen Orientierung FW- und RV-Richtung, Primerlänge, Annealingtemperatur und Größe des Amplikons dargestellt.

Tabelle 10: Übersicht der genspezifischen Ratten-Primer für die PCR. Neben der Bezeichnung in Spalte eins ist die Sequenz der Primer mit der Orientierung in Spalte zwei dargestellt. Spalte drei zeigt die Länge der Primer, in Spalte vier ist die Annealingtemperatur dargestellt und Spalte fünf zeigt die Größe des Amplikons.

Name	Sequenz (5' nach 3')	Länge	Annealingtemperatur	Größe
HPRT	FW: GTC CCA GCG TCG TGA TTA GT	20mer	60°C	141bp
	RV: CTC GAG CAA GTC TTT CAG TCC	21mer		
ER α	FW: GAC TAT GCC TCT GGC TAC CA	20mer	58°C	247bp
	RV: CTC TCT GAC GCT TGT GCT TC	20mer		
ER β	FW: GAA GTA GGA ATG GTC AAG TGT GGA TC	26mer	60°C	175bp
	RV: CCA GTT GCT CTG GAC TCA AGG T	22mer		

In Tab. 11 sind die verwendeten genspezifischen humanen Primer für die Real-Time PCR, mit ihrer Bezeichnung, der Sequenz mit ihrer Orientierung in FW- und RV-Richtung, der Primerlänge, dem eingesetzten Primerverhältnis und der Größe des Amplikons, dargestellt. Die Annealingtemperatur beider Primer beträgt 60°C.

Tabelle 11: Übersicht der genspezifischen humanen Primer für die Real-Time PCR. Neben der Bezeichnung in Spalte eins ist die Sequenz der Primer mit der Orientierung in Spalte zwei dargestellt. Spalte drei zeigt die Länge der Primer, Spalte vier zeigt das verwendete Primerverhältnis und Spalte fünf zeigt die Größe des Amplikons.

Name	Sequenz (5' nach 3')	Länge	Primerverhältnis (FW:RV)	Größe
GAPDH	FW: GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA	20mer	5pmol:5pmol	109bp
	RV: AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG	20mer		
MMP2	FW: TAC GAT GAT GAC CGG AAG TG	20mer	15pmol:15pmol	153bp
	RV:GGA AGT TCT TGG TGT AGG TG	20mer		

In Tab. 12 sind die verwendeten genspezifischen Primer zum Nachweis der 18S rRNA, ER α - und ER β -Expression in den verwendeten humanen Zelllinien dargestellt. Da die Primer für die Gene 18S rRNA und ER β nicht intronüberspannend sind, musste in Vorbereitung auf die PCR ein DNA-Verdau der isolierten Gesamt-RNA durchgeführt werden (Kapitel 2.2.3.2).

Tabelle 12: Übersicht der genspezifischen Primer für die PCR. Neben der Bezeichnung in Spalte eins ist die Sequenz der Primer mit ihrer Orientierung in Spalte zwei dargestellt. Spalte drei zeigt die Länge der Primer und Spalte vier die verwendeten Annealingtemperatur. Spalte fünf zeigt die Größe des Amplikons.

Name	Sequenz (5' nach 3')	Länge	Annealingtemperatur	Größe
18S rRNA	FW: CCG CAG CTA GGA ATA ATG GAA TA	23mer	60°C	108bp
	RV: TCT AGC GGC GCA ATA CGA AT	20mer		
ER α	FW: TCC TGA TGA TTG GTC TCG	18mer	58°C	140bp
	RV: ATG TAG CCA GCA GCA TGT	18mer		
ER β	FW: GAT CGC TAG AAC ACA CCT	18mer	56°C	180bp
	RV: GCC TTA CAT CCT TCA CAC	18mer		

2.1.11.2 Oligonukleotide für das Electrophoretic Mobility Shift Assay

Tabelle 13: Verwendete synthetisierte Oligonukleotide für den EMSA. Das Oligonukleotid „ganzer Bereich“ umfasst die hMMP2-Promotorregion von -315bp bis -266bp. Das Oligonukleotid „vorderer Bereich“ umspannt den Bereich von -324bp bis -287bp und das „Elk-1“ Oligonukleotid umfasst den Bereich von -296bp bis -256bp des humanen MMP2-Promotors (relativ zum Translationsstart, +1bp).

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Länge
Ganzer Bereich	sense: ggctacatctggcggtgccctccttgtttccgctcatccagactcc	50mer
	antisense: ggaagtctggatgcagcggaacaaggaggagggcagccgccagatgtagcc	50mer
Vorderer Bereich	sense: agcccagccggctacatctggcggtgccctccttgt	38mer
	antisense: acaaggaggaggcagccgccagatgtagccggctgggct	38mer
Elk-1	sense: cctccttgtttccgctcatccagactcctcagcttcg	41mer
	antisense: gcaagcctgaggaagtctggatgcagcggaacaaggagg	41mer

2.1.12 Kommerziell erworbene Kits

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten kommerziell erworbenen Kits

Bezeichnung	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kit	Agilent
BCA Protein Assay	PIERCE
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
ECL™ Detection Reagent	GE Healthcare Life Science
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Qiagen

2.1.13 DNA-Längenstandards und Protein-Längenmarker

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten DNA-Längenstandards und Protein-Längenmarker

Standard	Hersteller
100bp-DNA-Standard	Invitrogen
1kb-DNA-Standard	Invitrogen
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

2.1.14 Verwendete Computerprogramme

Die Identifikation putativer TF-Bindungsstellen erfolgte mit den Computerprogrammen MatInspector (<http://www.genomatix.de>), Transcription Element Search System (TESS) (<http://www.cbil.upenn.edu>) und AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com>). Die densitometrische Messung der detektierten Proteinbanden im Western Blot wurde mit Hilfe des Computerprogramms AlphaEaseFC™, Version 3.1.2 (Alpha Innotech Corporation) durchgeführt. Die Auswertung der gemessenen RNA-Quantität und -Qualität erfolgte mit Hilfe des Programms Agilent 2100 Expert (Version B.02.05.SI360) der Firma Agilent. Für die Auswertung der Real-Time-PCR-Läufe wurde auf das Programm ABI 7300 System Software v1.4.0 der Firma ABI zurückgegriffen.

2.1.15 Statistische Datenauswertung

Alle Messwerte sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (*Standard Error of the Mean* (SEM)) angegeben. Zur Erstellung der Graphiken sowie der Statistik wurden die Computerprogramme SigmaPlot Version 8.0 und SPSS Version 11.0 verwendet. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant definiert.

2.2 Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden genannt und deren Durchführung erläutert.

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien und primären Zellen wurden adhärent wachsend auf Zellkulturschalen unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchte von 95% im Zellkultur-Brutschrank *Heracell 150* der Firma Heraeus von Kendro.

2.2.1.1 Kultivierung

HT1080-, MCF-7 Zellen sowie primäre kardiale Fibroblasten wurden in DMEM-Vollmedium (im Folgenden Vollmedium) mit Phenolrot kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und bereits tote Zellen mit 1ml Trypsin/EDTA abgewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1ml Trypsin/EDTA und einer Inkubation bei 37°C für 5min. Die Enzymaktivität wurde durch die Zugabe von 9ml Vollmedium mit Phenolrot gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in Vollmedium mit Phenolrot resuspendiert und auf Zellkulturschalen mit vorgelegtem Medium verteilt. Die HT1080- und MCF-7 Zellen wurden auf zehn Zellkulturschalen mit je 9ml vorgelegtem Vollmedium mit Phenolrot verteilt. Die primären kardialen Fibroblasten wurden auf fünf Zell-Kulturschalen, mit je 8ml vorgelegtem Vollmedium mit Phenolrot verteilt. Die V236-Zellen wurden in M199-Vollmedium kultiviert. Die Zellen wurden nicht passagiert oder konserviert, sondern bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz mittels 1ml Trypsin/EDTA abgelöst und für die immunhistologische Färbung auf 8-Kammer-Objektträger verteilt (Kapitel 2.2.4.1).

DMEM-Vollmedium mit Phenolrot:	M199-Vollmedium:	Trypsin/EDTA:
DMEM mit Phenolrot 10% FKS (v/v) 1% HEPES 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin (v/v)	M199-Medium 20% FKS (v/v) 2% L-Glutamin (w/v) 0,5% bFGF (w/v) 1% Penicillin/Streptomycin (v/v)	0,25% Trypsin/1mM EDTA enthält Phenolrot

2.2.1.2 Kryokonservierung

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz mit 1ml Trypsin/EDTA abgelöst, in 9ml Vollmedium mit Phenolrot resuspendiert und bei 250xg (*Megafuge 1.0R*) für 10min bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml Einfriermedium aufgenommen, in ein vorgekühltes 2ml Kryo-Röhrchen überführt und anschließend im *Nalgene™Cryo 1°C Freezing Container* (Nalgene® Labware) bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt. Um die konservierten Zellen erneut zu kultivieren, wurde sie zügig im Wasserbad bei 37°C angetaut und in 9ml Vollmedium mit Phenolrot überführt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4°C und 250xg (*Megafuge 1.0R*) wurde das Zellpellet in 10ml Vollmedium mit Phenolrot resuspendiert und auf zwei Zellkulturschalen mit je 10ml vorgelegtem Medium verteilt. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch frisches Vollmedium mit Phenolrot ersetzt.

Einfriermedium:

95% DMEM-Vollmedium mit Phenolrot
5% DMSO (v/v)

2.2.1.3 Isolation kardialer Fibroblasten aus adulten Ratten

Die kardialen Fibroblasten wurden aus den Herzen adulter weiblicher und männlicher Wistar Ratten mittels Kollagenase-Dispase-Verdau, nach einem bereits in der Arbeitsgruppe Prof. Reitz-Zagrosek etablierten Protokoll in Anlehnung an eine Arbeit von Neuß *et al.*, isoliert.¹¹⁴ Pro Geschlecht wurden zwei Herzen isoliert und die daraus gewonnenen Fibroblasten zur Kultivierung gepoolt. Für die Entnahme des Herzens wurden die Ratten mit Isofluran narkotisiert und mit einem gezielten Kehlschnitt dekapitiert, die Bauchhöhle eröffnet und der Zugang zum Thorax durch das Zwerchfell ermöglicht. Das Herz wurde entnommen und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit 10ml kaltem DMEM mit Phenolrot überführt und auf Eis gelagert. Die weiteren Schritte wurden unter der Sterilbank (*Holten Lamin Air*) durchgeführt. Das Herz wurde in ein mit 25ml Phosphatgepufferte Saline (PBS) gefülltem 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und zur Entfernung der Erythrozyten mehrfach gespült. Anschließend wurde das Herz in eine mit kaltem PBS gefüllte Petrischale gelegt und mit einem Skalpell in 1-2mm große Stücke geschnitten. Die Myokardstücke wurden in einem 15ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit mehreren PBS-Spülungen von verbliebenen Erythrozyten befreit. Es folgte eine 15minütige Inkubation der Myokardstücke mit 5ml Kollagenase-Dispase-Puffer bei 37°C in einem Wasserbad. Nach

kräftigem Schütteln ließ man sie bei Raumtemperatur (RT) sedimentieren, der Überstand wurde in ein neues 50ml Zentrifugenröhrchen mit 15ml FKS überführt, um die Kollagenase-Dispase-Aktivität zu stoppen, und auf Eis gelagert. Der Verdau der restlichen Myokardstücke wurde so lange wiederholt, bis kein Restgewebe mehr vorhanden war. Die verdauten Myokardstücke wurden bei 250xg (*Megafuge 1.0 R*) für 5min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 10ml kaltem PBS gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert (250xg, 5min und 4°C), das PBS abgesaugt und das Zellpellet in 10ml Vollmedium mit Phenolrot aufgenommen. Die Zellen wurden auf eine Zellkulturschale gegeben und für 1h im Brutschrank inkubiert, so dass die Fibroblasten adhären konnten. Zur Entfernung nicht adhärenter sowie abgestorbener Zellen wurde das Medium entfernt und durch 10ml frisches Vollmedium mit Phenolrot ersetzt. An den drei darauf folgenden Tagen wurden die Fibroblasten mit PBS gewaschen und mit frischem Vollmedium mit Phenolrot versetzt. Die anschließende Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben.

Kollagenase-Dispase-Puffer:

20mg DNase (>2000U/mg)
 16g NaCl
 0,74g KCl
 0,2g Na₂HPO₄
 12g HEPES
 4g Glukose
 ad 2l Aqua bidest., pH 7,3 einstellen, sterilfiltrieren
 und bei -20°C in 500ml Aliquots einfrieren

Puffer nach dem Auftauen mit:

BSA	5g /500ml
Kollagenase TypI (187U/mg)	2mg/ml
Dispase (6U/mg)	2mg/ml

versetzten und 25ml weise aliquotieren und bei -20°C lagern (Nur 1 Jahr haltbar).

Puffer kurz vor der Aufarbeitung mit:

25ml Kollagenase/Dispase-Puffer
 120µl 2,5% Trypsin
 188µl 0,1 M CaCl₂-Lösung (sterilfiltriert)

versetzten und auf Eis lagern. Angaben sind für die Aufarbeitung von einem Rattenherz.

2.2.1.4 Behandlung der isolierten kardialen Fibroblasten mit 17β-Estradiol

Für die Behandlung der isolierten kardialen Fibroblasten mit E2 wurden die Zellen in der zweiten Passage verwendet. Hierfür wurden die Fibroblasten bis zur ersten Passage in Vollmedium mit Phenolrot kultiviert (Kapitel 2.2.1.1). Eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung der Zellen mit E2 ist die Kultivierung der Zellen unter östrogenarmen Bedingungen für mehrere Tage. Aus diesem Grund wurden die Fibroblasten ab der zweiten Passage in Vollmedium ohne Phenolrot kultiviert, da Phenolrot östrogenähnliche Eigenschaften besitzt.¹¹⁵ Um zu-

sätzlich die Konzentration an Steroidhormonen im Kulturmedium zu reduzieren, wurde Aktivkohle-behandeltes FKS (charcoal-stripped, im Folgenden c.s. FKS) verwendet. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Zellen mit Trypsin/EDTA ohne Phenolrot abgelöst wurden. Für eine bessere Handhabung der Stimulation wurden die kardialen Fibroblasten ab der zweiten Passage auf 6-Loch-Zellkulturplatten überführt. Hierfür wurde zunächst das Vollmedium mit Phenolrot entfernt und das restliche Medium sowie bereits tote Zellen mit 10ml PBS abgewaschen. Das Ablösen und Vereinzeln erfolgte durch die Zugabe von 2ml Trypsin/EDTA und Inkubation der Zellen bei 37°C für 5min. Durch die Zugabe von 9ml Vollmedium ohne Phenolrot wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert, die Zellen resuspendiert und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um Reste des Phenolrots und FKS von den Zellen zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation bei 250xg (*Megafuge 1.0 R*) für 10min bei 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Vollmedium ohne Phenolrot aufgenommen und auf 6-Loch-Zellkulturplatten, wobei die Zellen einer Zell-Kulturschale auf zwei 6-Loch-Platten verteilt wurden, ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank, wobei alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Erreichten die Fibroblasten eine Konfluenz von ~70-80%, wurde das Vollmedium ohne Phenolrot gegen Hungermedium ausgewechselt. Mit dem niedrigen Gehalt an 2,5% c.s. FKS sollte der unspezifische Einfluss der enthaltenen Wachstumsfaktoren minimiert werden. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit dem Hungermedium erfolgte die Behandlung der Zellen mit 10⁻⁸M E2. Als Kontrolle wurde Dextrin eingesetzt, da E2 für eine bessere Wasserlöslichkeit damit ummantelt war. Das Dextrin wurde dabei in adäquater Konzentration zu der im 10⁻⁸M E2 enthaltenen Menge eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 10⁻⁵M ICI 182,780 (ICI), einem E2-Antagonisten¹¹⁶ der Firma TOCRIS sowie einer Kombination aus E2 und ICI behandelt. ICI wurde dabei 1h vor der E2-Behandlung auf die Zellen gegeben, um sicher zu gehen, dass die ER vollständig blockiert sind. Alle Agenzien wurden vor jedem Versuch frisch mit Hungermedium auf ihre jeweilige Endkonzentration verdünnt und für eine Dauer von 6h, 12h, 24h und 48h mit den Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und, wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, die Gesamt-RNA der kardialen Fibroblasten isoliert.

DMEM-Vollmedium ohne Phenolrot:	Hungermedium:	Trypsin/EDTA:
DMEM ohne Phenolrot 10% c.s. FKS (v/v) 1% HEPES 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin (v/v)	DMEM ohne Phenolrot 2,5% c.s. FKS (v/v) 1% HEPES 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin (v/v)	0,05% Trypsin/1mM EDTA Enthält kein Phenolrot

2.2.1.5 Transiente Transfektion

Für die Transfektion wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, ausgesät und für 24h kultiviert. In Vorbereitung auf die anschließende Behandlung mit E2 wurden die Zellen einmal mit PBS (RT) gewaschen und das Medium gegen Vollmedium ohne Phenolrot ausgetauscht. Nach einer dreitägigen Kultivierung der Zellen und einer Konfluenz von mindestens 80% wurden die Zellen einer Zellkulturschale auf vier 12-Loch-Platten für die hMMP2-Promotor-Analyse und auf vier 6-Loch-Platten für die Gesamtprotein-, bzw. Zellkernextrakt-Isolation verteilt. Hierfür wurden die Zellen in Vollmedium ohne Phenolrot aufgenommen und zu jeweils 1 bzw. 2ml pro Loch verteilt. Am nächsten Tag wurde die Zellen bei einer Konfluenz von ~70% mit dem jeweiligen Plasmid mit Hilfe des Transfektionsreagenz Fugene® 6 in einem Verhältnis von 3:1 (Fugene:DNA) transient transfiziert. Hierfür wurde das Vollmedium der Zellen gegen Medium ohne Antibiotika gewechselt und für 2h im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde der Transfektionsansatz zusammengestellt und für 20min bei RT inkubiert und danach mit 50µl pro Loch auf die 12-Loch-Platten, bzw. mit 100µl pro Loch auf die 6-Loch-Platten verteilt. Die Transfektionsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

50µl Transfektionsansatz (1x):

1µg Reporter-Konstrukt

500ng hESR1-pSG5

10ng pRL-CMV Vektor

3µl Fugene 6

ad 50µl DMEM ohne Phenolrot

100µl Transfektionsansatz (1x):

1µg hESR1-pSG5

6µl Fugene 6

ad 100µl DMEM ohne Phenolrot

Nach 24h wurde das Transfektions-Medium abgenommen und es erfolgte die sofortige Weiterbehandlung der transfizierten Zellen wie in Kapitel 2.2.1.6 beschrieben.

Vollmedium ohne Phenolrot/Antibiotikum:

DMEM ohne Phenolrot

10% (v/v) c.s. FKS

1% HEPES

2.2.1.6 Stimulation transfizierter Zellen

An die Transfektion schloss sich die Behandlung der Zellen mit 10^{-8} M E2 und Dextrin als Kontrolle an. Um den ER-abhängigen Effekt von E2 zu blockieren, wurden die Zellen zusätzlich mit

10^{-5} M ICI behandelt. Um die Aktivität des *Mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Signalweges zu hemmen, wurden die Zellen mit $10\mu\text{M}$ des spezifischen MAPK-Blockers PD98059 inkubiert. PD98059 ist ein spezifischer Inhibitor des MAPK-*extracellular regulated kinase 1/2* (ERK1/2) Signalweges, der die Phosphorylierung der MAPK-Kinase 1/2 (MEK1/2) und somit die Aktivierung von ERK1/2 unterbindet. Die Behandlung der Zellen mit den beiden Inhibitoren erfolgte 1h vor der Inkubation mit E2. Die Agenzien wurden vor jedem Versuch frisch mit Hungermedium in ihrer jeweiligen Endkonzentration angesetzt und jeweils mit 1ml (12-Loch-Platten), bzw. 2ml (6-Loch-Platten) auf die Zellen verteilt. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die behandelten Zellen der 12-Loch-Platten für die Luciferase-Reporter-Assays (Kapitel 2.2.1.7) geerntet. Die Zellen der 6-Loch-Platten wurden für die Isolation der Gesamtproteine (Kapitel 2.2.5.1), des Zellkernextrakts (Kapitel 2.2.5.2) und der Gesamt-RNA (Kapitel 2.2.3.1) geerntet.

2.2.1.7 Zellernte für die Luciferase-Reporter-Assays

Nach Beendigung der 24-stündigen Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Agenzien wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Zum Ernten wurden die transfizierten Zellen mit $200\mu\text{l}$ DMEM ohne Phenolrot bedeckt, mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, in ein $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Um die Zellen aufzuschließen wurden die Proben über Nacht (üN) bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag bei RT aufgetaut. Um Zelltrümmer sowie die nicht lysierten Zellen abzutrennen, wurde die Zellsuspension für 2min bei 4°C und $17.530\times g$ (*Mikro 22R*) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.8 Luciferase-Reporter-Assays

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde das Dual-Glo™ Luciferase Assay System der Firma Promega nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Hierfür wurden für die Messung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität pro Loch einer 96-Loch-Platte $75\mu\text{l}$ Zelllysate gemeinsam mit $75\mu\text{l}$ Dual-Glo™ Luciferase Reagenz gegeben. Anschließend wurden die Proben in einem Luminometer (*1420 Multilabel Counter Victor³™*) für 10s geschüttelt und nach 10minütiger Inkubation bei RT für jeweils 10s vermessen. Zur Aktivitätsbestimmung der *Renilla*-Luciferase-Aktivität wurden $75\mu\text{l}$ Dual-Glo™ Stop&Glo® Reagenz dazu gegeben und nach 10s schütteln und 10minütiger Inkubation bei RT vermessen. Da jeder Transfektionsansatz in Dreifachbestimmung durchge-

führt wurde, wurde für die Auswertung der Quotient aus *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität gebildet und daraus für jeden Ansatz der MW und SEM berechnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) verwendet. Hierfür wurden 200ml antibiotikumhaltiges LB-Medium (100µg/ml Ampicillin) mit einer *E.coli*-Glycerinkultur (Kapitel 2.2.2.2) am Vortag angeimpft und üN bei 37°C und 200U/min geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA gemäß dem Protokoll der Firma Qiagen isoliert. Die präzipitierte DNA wurde in Aqua bidest. aufgenommen und mittels Photometer die DNA-Konzentration gemessen, sowie die Reinheit bestimmt (Kapitel 2.2.2.3). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.2.2 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der transformierten *E. coli* wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurde die Bakterienkultur mit 50%igem Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Photometers *Genyses 6*. Dabei wurde die Lichtabsorbtion bei 260nm im Vergleich zum Lösungsmittel gemessen, wobei eine optische Dichte bei 260nm (OD_{260}) von Eins einer DNA-Konzentration von 50µg/ml entspricht. Nach entsprechender Berücksichtigung des eingesetzten Verdünnungsfaktors erhielt man die Konzentration der gemessenen DNA-Lösung. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} ermittelt, der bei einem Wert von mindestens 1,8 liegen sollte. Standardgemäß wurde für jede Messung eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Kontrolle der PCR-Amplifikate wurden diese über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde 1-2% (w/v) Agarose in 120ml 1xTBE-Puffer erhitzt und mit 5µl Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Erkalten des Gels auf RT wurden die zu analysierenden Proben mit 0,2 Volumen Ladepuffer (6x) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTBE-Puffer bei 120V. Die DNA wurde unter UV-Licht durch die Interkalierung des Ethidiumbromids sichtbar und abschließend fotodokumentiert.

TBE-Puffer (10x):

890mM Tris
890mM Borsäure
20mM EDTA
pH 8,3; Verdünnung erfolgte mit Aqua bidest.

2.2.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma SMB durchgeführt. Die sequenzierte DNA wurde mit Hilfe der Computerprogramme Chromas 1.4 und BLAST (NCBI) analysiert.

2.2.3 RNA-Analyse

2.2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den kultivierten Zellen wurden sie zunächst mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkulturplatten auf Eis gelagert, in jedes Loch 500µl Trizol[®]-Reagenz (TEL-TEST INC., USA) gegeben und die Zellen mittels Zellschaber abgeschabt. Die Suspension wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, 100µl Chloroform hinzu gegeben und für 2min gevortext. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10min bei 17.530xg (*Mikro 22 R*) und 4°C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die RNA in bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die RNA für 30min bei 4°C und 17.530xg (*Mikro 22 R*) pelletiert, der Überstand dekantiert und das RNA-Pellet zweimal mit 1ml 80%-igem Ethanol gewaschen und für jeweils 5min bei 5720xg (*Mikro 22 R*) bei 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet, je nach Größe in 20-25µl DEPC-H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA

Für den Nachweis der ER α und ER β Genexpression in den humanen Zelllinien wurden Primer eingesetzt (Tab. 12), die nicht intronüberspannend sind. Aus diesem Grund musste nach der Isolation der Gesamt-RNA ein DNase-Verdau angeschlossen werden, um die in den Proben noch eventuell vorhandene DNA zu inaktivieren. Hierfür wurden die folgenden Komponenten, jeweils für einen Ansatz, für 10min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt:

5 μ g RNA
1 μ l DNase (10U/ μ l)
7,5 μ l MnCl₂ (8mM)
1 μ l RNase-Inhibitor (RNase out) (40U/ μ l)
ad 60 μ l DEPC-H₂O

Im Anschluss an den DNase-Verdau wurden die Proben mit Trizol[®] aufgearbeitet (Kapitel 2.2.3.1) und Quantität und Qualität der isolierten Gesamt-RNA bestimmt (Kapitel 2.2.3.3). Um den Erfolg des DNase-Verdau zu kontrollieren, wurden die Proben mittels PCR und dem spezifischen Primer für die 18S rRNA auf eventuelle DNA-Verunreinigungen kontrolliert (Kapitel 2.2.3.5).

2.2.3.3 Qualitative und Quantitative Messung der isolierten RNA

Die Quantität und Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kits* der Firma Agilent Technologies bestimmt. Die Durchführung erfolgte laut Angaben des Herstellers. Die Vermessung erfolgte mit Hilfe des *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Anschließend wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.3.4 Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA) wurden 500ng isolierter Gesamt-RNA mit DEPC-H₂O auf 10 μ l Gesamtvolumen verdünnt und mit 2 μ l Random-Hexamer-Primern (300ng/ μ l) versetzt. Als Negativkontrolle wurde anstelle der RNA-Lösung ein Ansatz mit 10 μ l DEPC-H₂O eingesetzt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 10min bei 70°C. Anschließend wurde die Lösung für 3min auf Eis gelagert und der RT-PCR-Mix, der die folgenden Bestandteile beinhaltet (die Mengen gelten beispielhaft für einen Ansatz), hergestellt:

4µl 5xRT-PCR-Puffer (250mM Tris-HCl (pH 8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂)
 1µl 10mM dNTP-Mix
 1µl RNase-Inhibitor (RNase out) (40U/µl)
 2µl 100mM DTT
 1µl Reverse Transkriptase (Superscript-II) (200U/µl)

Zu der RNA-Lösung wurden 9µl des RT-PCR-Mix gegeben, gevortext, zentrifugiert und anschließend für 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die RT-PCR durchgeführt (60min bei 42°C; 5min bei 95°C). Zum Abschluss wurden die cDNA-Proben auf Eis abgekühlt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Optimierung der Annealingtemperatur für die in der Real-Time-PCR eingesetzten Primer, sowie die Expressionsanalyse von ER α und ER β in den HT1080- und MCF-7 Zellen erfolgte mit Hilfe der PCR. Hierfür wurden folgende Komponenten in ein 0,5ml Reaktionsgefäß zusammengegeben:

2,5µl 10xPCR-Puffer
 0,75µl MgCl₂ (50mM)
 4µl dNTPs
 0,2µl Taq Polymerase (5U/µl)
 5µl Primermix (jeweils 1,6pmol FW- und RV-Primer)
 25ng cDNA
 ad 25µl Aqua bidest.

Die PCR wurde im Gradientencycler (*Mastercycler Gradient*) in folgenden Schritten durchgeführt:

Tabelle 16: PCR-Bedingungen

<i>Schritt</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Zeit und Temperatur</i>
Denaturierung	1	5min 95°C
Denaturierung	} 40	30s 95°C
Annealing		30s verschiedene Annealingtemperaturen
Elongation		30s 72°C
Elongation	1	10min 72°C

Der Temperaturgradient, der zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur eingesetzt wurde, betrug von 58°C ausgehend $\pm 4^\circ\text{C}$ in 2°C Schritten. Abschließend wurden die Amplifikate auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und auf die korrekte Produktgröße sowie etwaige Nebenprodukte überprüft. Für alle untersuchten Primerpaare, die in die Real-Time-PCR eingesetzt werden sollten, ergab sich eine optimale Annealingtemperatur von 60°C .

2.2.3.6 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine Methode zur Bestimmung der Transkriptionsrate bestimmter Gene und wurde für jede Probe im Doppelansatz durchgeführt. Die Primer für die jeweiligen zu untersuchenden Zielgene sind in der Tab. 9 und 11 dargestellt und mussten zunächst auf das optimale Verhältnis zueinander untersucht werden. Hierfür wurden die Primer auf eine Konzentration von $5\text{pmol}/\mu\text{l}$ verdünnt und in vier verschiedene Reaktionsansätze mit einem Verhältnis von FW- und RV-Primer von 1:1, 1:3 und 3:1 eingesetzt. Zusätzlich wurden die Primer in einem Verhältnis von 1:1 mit einer jeweiligen Konzentration von $15\text{pmol}/\mu\text{l}$ getestet. Als Template dienten 25ng cDNA aus gepoolten Proben und die Analyse wurde im TAQ-Man *ABI 7000* durchgeführt. Die Ermittlung des optimalen Primerverhältnisses erfolgte unter Berücksichtigung des Verlaufs der Amplifikations- und Schmelzkurve bei übereinstimmenden Ergebnissen aus den Doppelansätzen. Das optimale Verhältnis der verwendeten Primer ist in der Tab. 9 und 11 mit dargestellt. Zur Quantifizierung der mRNA der zu untersuchenden Zielgene wurden folgende Reaktionsansätze (die Mengen gelten beispielhaft für einen Ansatz) zusammengestellt:

Reaktionsansatz :	Reaktionsansatz für ERα:	Reaktionsansatz für ERβ:
12,5 μl TaqMan [®] Universal PCR Master Mix 1 μl FW-Primer 1 μl RV-Primer x μl Template ad 25 μl Aqua bidest.	10 μl Power SYBR [®] Green PCR Master Mix 1 μl Sonden-System x μl Template ad 20 μl Aqua bidest.	12,5 μl Power SYBR [®] Green PCR Master Mix 0,2 μl FAM-Sonde (20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$) 0,2 μl FW-Primer (20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$) 0,2 μl RV-Primer (20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$) x μl Template ad 25 μl Aqua bidest.

Die Proben wurden auf Eis in eine 96-Loch-Platte pipettiert, bei 4°C kurz zentrifugiert und im Anschluss die PCR-Reaktion nach folgendem Programm gestartet:

Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die Real-Time PCR

<i>Schritt</i>	<i>Zyklus</i>	<i>Zeit und Temperatur</i>
Denaturierung	1	10min 95°C
Denaturierung Annealing Elongation	} 40	15s 95°C 1min 60°C
Dissoziationskurve	1	15s 95°C 1min 60°C 15s 95°C

Die mRNA-Menge wurde anhand einer Standardreihe mit dem Programm der ABI 7300 System Software v1.4.0 errechnet und im Verhältnis zur Menge der mRNA des Referenzgens angegeben. Hierfür diente als endogener Standard (Housekeeping Gen) Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) für die Untersuchungen der mRNA-Expression in den kardialen Fibroblasten und in den HT1080-Zellen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die MW eines jeden Doppelansatzes wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Excel (Microsoft) auf die entsprechende Mittelwertprobe des Referenzgens HPRT oder GAPDH bezogen. Durch den Vergleich der Quotienten der einzelnen Proben der verschiedenen Gruppen konnten stimulierte mit nicht-stimulierten Proben verglichen werden.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Zur Charakterisierung sowie zur Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten kardialen Fibroblasten wurden die Zellen immunhistochemisch angefärbt. Außerdem erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten mittels spezifischer Antikörper (AK).

2.2.4.1 Zellcharakterisierung

Zur Charakterisierung wurden die Zellen auf 8-Kammer-Objekträgern in einer Dichte von 20.000 (kardialen Fibroblasten) bzw. 100.000 (V236-Zellen) Zellen in 500 μ l Vollmedium mit Phenolrot pro Kammer ausgesät. Nach einer μ N-Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 3% Formaldehyd/PBS für 30min bei RT fixiert. Es folgten ein Waschschrift in PBS und ein weiterer mit Glycin-Puffer/PBS für jeweils 5min. Anschließend wurden die Zel-

len mit PBS gewaschen und für 4min bei RT mit 0,1% TritonX-100/PBS permeabilisiert. Es folgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS und eine 30min Blockierung mit 1% BSA/PBS. Die Inkubation der Zellen mit dem Primär-AK Vimentin (1:50) oder Von Willebrand Faktor (1:100) in 0,1% BSA/PBS erfolgte für 1h bei RT. Nichtgebundener Primär-AK wurde durch dreimaliges Waschen für jeweils 5min mit 0,1% BSA/PBS entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Sekundär-AK Cy3 (1:50 in 0,1% BSA/PBS) und FITC (1:50 in 0,1% BSA/PBS) für 45min im Dunkeln. Überschüssiger Sekundär-AK wurde durch 3maliges Waschen für 5min mit 0,1% BSA/PBS entfernt. Um eine bessere Orientierung unter dem Mikroskop zu erreichen, wurden die Zellkerne mit Hilfe der DAPI-Färbung markiert. Hierfür wurden auf jede Kammer 10µl einer DAPI-Lösung (1:20.000 Verdünnung in PBS einer 2µg/µl Stocklösung) gegeben und sofort wieder abgenommen. Abschließend wurden die Zellen nochmals mit 0,1% BSA-PBS für 5min gewaschen. Nach Entfernung der Kammerwände wurde der Objektträger kurz luftgetrocknet und das Deckglas vor dem Zudecken mit ausreichend *VECTASHIELD[®] Mounting* Eindeckmedium (Vector Laboratories) versehen. Die Ränder des Deckglases wurden auf dem Objektträger mit Nagellack versiegelt und das Präparat bis zum Mikroskopieren dunkel bei -20°C aufbewahrt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop.

3% Formaldehyd/PBS:	Glycin-Puffer/PBS:
37% Formaldehyd auf 3% mit PBS verdünnen	1M Glycin-Puffer, pH 8,5 mit Tris-Base Einige Tropfen mit PBS verdünnen
0,1% Triton X-100:	1% BSA/PBS:
100% Triton X-100 auf 0,1% mit PBS verdünnen	BSA auf 1% BSA mit PBS verdünnen
0,1% BSA/PBS:	DAPI-Lösung (2µg/µl):
1% BSA mit PBS auf 0,1% verdünnen	1:20.0000 mit PBS verdünnen

2.2.4.2 Lokalisation von ER α und ER β

Zum immunhistochemischen Nachweis von ER α und ER β wurden die kardialen Fibroblasten auf 8-Kammer-Objektträger in einer Zelldichte von 20.000 Zellen in 500µl Vollmedium ohne Phenolrot pro Kammer ausgesät. Nach einer μ N-Inkubation wurden die Zellen mit 10⁻⁸M E2 oder Dextrin als Vehikel für 24h behandelt, wobei die Stimulanzen in frischem Hungermedium gelöst wurden. Fixierung, Permeabilisierung, Blocken und Waschen der Zellen, sowie die Anfärbung mit DAPI erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben. Die Verdünnung der Primär- so-

wie Sekundär-AK erfolgte in 0,1% BSA/PBS. Die Fibroblasten wurden jeweils mit den Primär-AK gegen ER α (1:100), ER β (1:100) und ER α und ER β jeweils in Kombination mit Vimentin (1:50) für 60min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit dem FITC- bzw. Cy3 markierten Sekundär-AK in einer 1:50 Verdünnung inkubiert. Die Objektträger wurden wie oben beschrieben eingedeckt und bis zum Mikroskopieren bei -20°C dunkel aufbewahrt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Konfokal-Laser-Mikroskop.

2.2.5 Proteinchemische Methoden

Um zu verhindern, dass die zu extrahierenden Proteine während der Präparation abgebaut werden, wurden alle Schritte auf Eis und bei 4°C durchgeführt.

2.2.5.1 Präparation von Gesamtprotein

Für die Isolation des Gesamtproteins aus HT1080-Zellen wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1.1 kultiviert, transfiziert (Kapitel 2.2.1.5) und für 24h mit verschiedenen Agenzien behandelt (Kapitel 2.2.1.6). Anschließend wurden die HT1080-Zellen einer 6-Loch-Platte (~10³ Zellen) mit kaltem PBS gewaschen und nach Zugabe von 2ml DMEM ohne Phenolrot mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 250xg (*Megafuge 1.0R*) für 10min sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit kaltem PBS gewaschen, bei 250xg (*Megafuge 1.0R*) für 10min zentrifugiert und das PBS abgenommen. Nachfolgend wurde das Zellpellet in 500 μ l Lysispuffer resuspendiert, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 20min im Kühlraum auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 17.530xg (*Mikro 22 R*) für 15min wurde der Überstand aliquotiert und bis zum Auftrag auf ein SDS-Gel bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben.

Lysispuffer (Double Detergent Lysis Puffer):

10mM Tris, pH 7,5
140mM NaCl
1mM EDTA
25% Glycerol (v/v)
0,5% SDS
0,5% Nonident P-40
Vor Gebrauch frisch dazugeben:
0,1mM DTT
0,5mM PMSF
100ng/ml Proteinaseinhibitor Cocktail und 1fach Phosphostopp (Roche)

2.2.5.2 Präparation von Zellkernextrakt

In Anlehnung an ein Protokoll der Datenbank *Celldeath* (<http://www.celldeath.de/apometh/emsa.html>) wurde die Isolierung des Kernextrakts aus HT1080-Zellen durchgeführt. In Vorbereitung wurden die Zellen zunächst transfiziert (Kapitel 2.2.1.5) und mit 10^{-8} M E2, Dextrin und 10^{-5} M ICI behandelt (Kapitel 2.2.1.6). Anschließend wurden die HT1080-Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit 2ml DMEM ohne Phenolrot pro Loch mit dem Zellschaber vom Boden abgeschabt, wobei die Zellen von drei 6-Loch-Platten ($\sim 10^9$ Zellen) vereint wurden. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10min bei 250xg (*Megafuge 1.0R*) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 10ml kaltem PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 250xg (*Megafuge 1.0R*) für 10min wurde das PBS abgesaugt und das Zellpellet in 100 μ l Saccharosepuffer resuspendiert. Die geschwollenen und aufgeplatzten Zellen wurden zur Abtrennung der Zellkerne für 5min bei 500xg (*Mikro 22 R*) zentrifugiert. Der Überstand mit den zytosolischen Proteinen wurde abgenommen und das Pellet mit 1ml Waschpuffer vorsichtig durch auf- und abpipettieren gelöst. Nach erneuter Zentrifugation bei 500xg (*Mikro 22 R*) für 5min wurde der Waschpuffer komplett abgenommen und das Pellet mit 30 μ l Niedrigsalzpuffer versetzt. Das Pellet wurde vorsichtig gelöst und das gleiche Volumen an Hochsalzpuffer tröpfchenweise dazu gegeben. Durch kontinuierliches und vorsichtiges Schütteln der Reaktion für 45min auf einer Drehscheibe im Kühlraum erfolgte die Extraktion der Kernproteine. Es erfolgte die Abtrennung des Zellkernextrakts von den unlöslichen Bestandteilen durch eine abschließende Zentrifugation für 15min bei 14.000xg (*Mikro 22 R*). Der Überstand mit den Zellkernproteinen wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben. Um eine korrekte Trennung der Zellkernproteine von den Proteinen der zytosolischen Fraktion zu überprüfen, wurde mit Hilfe der AK gegen den TATA-Box bindenden Transkriptionsfaktor IID (TFIID, nukleärer Marker) und Calpain 1/2 (zytosolischer Marker) eine Western Blot Analyse, wie in Kapitel 2.2.5.6 beschrieben, durchgeführt.

Saccharosepuffer:

0,32M Saccharose
 10mM Tris HCl pH 8,0
 3mM CaCl_2
 2mM MgOAc
 0,1mM EDTA
 0,5% NP-40
 in Aqua bidest. lösen
 1mM DTT
 0,5mM PMSF frisch dazugeben

Waschpuffer:

0,32M Saccharose
 10mM Tris HCl pH 8,0
 3mM CaCl_2
 2mM MgOAc
 0,1mM EDTA
 in Aqua bidest. lösen
 1mM DTT
 0,5mM PMSF frisch dazugeben

Niedrigsalzpuffer:

20mM HEPES pH 7,9
 1,5mM MgCl₂
 20mM KCl
 0,2mM EDTA
 25% Glycerin (v/v)
 in Aqua bidest. lösen
 0,5mM DTT
 0,5mM PMSF frisch dazugeben

Hochsalzpuffer:

20mM HEPES pH 7,9
 1,5mM MgCl₂
 800mM KCl
 0,2mM EDTA
 25% Glycerin (v/v)
 1% NP-40
 0,5mM DTT
 in Aqua bidest. lösen
 1fach complete Mini (Roche) und 1fach Phosphostopp
 frisch dazugeben

2.2.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde mit dem BCA-Kit der Firma Pierce anhand des Protokolls des Herstellers bestimmt.

2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Hierfür wurden sowohl große SDS-Trenngele (20,5 x 8,5cm) als auch Minigele (10 x 10cm) verwendet. Die 1 und 1,5mm starken Trenngele wurden mit 10 bzw. 12% Polyacrylamid (PAA) in der Trenngellösung hergestellt. Nachdem das Trenngel ün auspolymerisierte, wurde dieses mit einer 5%igen PAA-Sammelgellösung überschichtet. Die Proben wurden mit *Roti[®]-Load 1* (4x konzentriert) im Verhältnis 1:4 (v/v) versetzt und anschließend für 10min bei 95°C denaturiert. Um die Größe der getrennten Proteine abschätzen zu können, wurde als Größenstandard der *Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder* verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (100V) im Kühlraum bei 4°C. Wenn die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Trenngels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine entweder im Gel mittels Coomassie-Färbung angefärbt, oder durch Immunoblotting auf eine Membran transferiert und weiter analysiert.

10ml SDS-Trenngel (10%, 10 x 10cm):

4ml Aqua bidest.
 3,3ml 30% PAA (w/v)
 2,5ml 1M Tris-HCl, pH 8,8
 0,1ml 10% SDS (w/v)
 0,1ml 10% APS (w/v)
 4µl TEMED

10ml SDS-Trenngel (12%, 10 x 10cm):

3,3ml Aqua bidest.
 4ml PAA (30%)
 2,5ml 1M Tris-HCl, pH 8,8
 0,1ml SDS (10%)
 0,1ml APS (10%)
 4µl TEMED

15ml SDS-Trenngel (10%, 20,5 x 8,5cm):

5,9ml Aqua bidest.
 5ml 30% PAA (w/v)
 3,8ml 1M Tris-HCl, pH 8,8
 0,15ml 10% SDS (w/v)
 0,15ml 10% APS (w/v)
 6µl TEMED

5ml SDS-Sammelgel (5%):

3,4ml Aqua bidest.
 830µl 30% PAA (w/v)
 630µl 1M Tris-HCl, pH 6,8
 50µl 10% SDS (w/v)
 50µl 10% APS (w/v)
 5µl TEMED

Elektrophorese-Puffer (5x):

15,1g Tris Base pH 8,8
 94g Glycerin
 50ml 10% SDS (w/v)
 mit Aqua bidest. auf 1l auffüllen, pH 8,3 einstellen
 Verdünnen auf 1x mit Aqua bidest.

2.2.5.5 Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbung

Um zu überprüfen, ob alle Proteine beim Immunoblotten auf die Nitrozellulose-Membran transferiert oder gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden, wurde das Gel für 1h oder üN in Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbelösung inkubiert. Nach der Färbung wurde das Gel in Entfärbelösung so lange entfärbt, bis die Intensität der Banden deutlich stärker war als der Hintergrund.

Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbelösung:

0,25% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250
 45% Methanol (v/v)
 10% Essigsäure (v/v)

Entfärbelösung:

40% Methanol (v/v)
 10% Essigsäure (v/v)

2.2.5.6 Western Blot Analyse

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Bioscience) transferiert. Somit konnten bestimmte Proteine mittels Immunofärbung und spezifisch bindender AK detektiert werden. Hierfür wurden das Polyacrylamidgel sowie die Membran für 10min in Transferpuffer äquilibriert. Nach der In-

kubation wurden das Gel und die Membran zwischen Whatman-Papieren und Schwämmen „sandwichartig“ eingebettet und in eine mit 5l 1xTransferpuffer befüllte Elektro-Blot-Kammer (Bio-Rad) eingeführt. Das Blotten erfolgte bei konstanter Spannung (100V) für 1,5h im Kühlraum. Um den erfolgreichen Transfer der Proteine zu überprüfen, wurde die Membran für 1min mit Ponceaurot, das Proteine unspezifisch und reversibel anfärbt, anschließend zweimal für jeweils 5min mit Aqua bidest. gewaschen und bis zur AK-Hybridisierung bei 4°C gelagert.

Transferpuffer (4x):

138,38g Glycin
 29,09g Tris Base, pH 8,8
 Mit Aqua bidest. auf 2l auffüllen
 1Teil gebrauchsfertigen Puffer plus 1 Teil Methanol
 auf 5l mit Aqua bidest. auffüllen

Ponceau Rot:

0,1% Ponceau S (w/v)
 5% Essigsäure (v/v)

2.2.5.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Vor der AK-Hybridisierung wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst für 1h bei RT unter sanftem Schütteln im Blockierungspuffer inkubiert, wobei unspezifische Bindungen des AK minimiert werden sollten. Zum Blockieren wurde der Puffer mit 5% fettfreier Magermilch verwendet. Wurde die Membran mit p-Elk-1 hybridisiert, wurde Puffer mit 5%igem BSA eingesetzt, welcher auch zum Verdünnen des AK verwendet wurde. Anschließend erfolgte unter leichtem Schütteln eine 1h-Inkubation bei 4°C mit dem spezifischen Primär-AK, der in dem Blockierungspuffer verdünnt wurde (Tab. 18). Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10min mit TBS-T wurde die Membran für 1h bei RT mit dem Horse-Raddish-Peroxidase (HRP) markierten Sekundär-AK (Tab.18) inkubiert. Abschließend wurden nichtgebundene AK durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für 10min entfernt, die Membran von überschüssiger Flüssigkeit befreit und die zu analysierenden Proteine mittels Chemilumineszenz-Verfahren detektiert. Hierfür wurde die Membran mit ausreichend Detektions-Lösung (*ECL™ Detection Reagent*) für 4min benetzt, überschüssiges Reagenz durch Abtropfen entfernt und in Cellophan-Folie eingeschlagen. Anschließend wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak) in eine lichtabschirmende Kassette gelegt und in der Entwicklermaschine *Curix 60*, der Firma AGFA entwickelt. Der entwickelte Röntgenfilm wurde in einen Durchsichtsscanner gelegt, eingescannt und mit Hilfe des Computerprogramms AlphaEaseFC™ die Intensität der Protein-Banden densitometrisch ausgewertet.

Tabelle 18: Übersicht der in den Western Blot Analysen verwendeten Antikörper. Dargestellt sind die verwendeten primären Antikörper mit der eingesetzten Verdünnung sowie der verwendeten sekundären Antikörper mit der eingesetzten Verdünnung

Primär-Antikörper		Sekundär-Antikörper	
Name	Verdünnung	Name	Verdünnung
Anti-Elk-1	1:1000	Esel-anti-Maus	1:10.000
Anti-p-Elk-1	1:1000	Esel-anti-Maus	1:10.000
Anti-GAPDH	1:50.000	Esel-anti-Maus	1:15.000
Anti-Calpain 1/2	1:2000	Esel-anti-Maus	1:10.000
Anti-TF IID	1:100	Esel-anti-Kaninchen	1:10.000

Zur Korrektur von Varianzen während des Proteintransfers, wurden die Proben im Doppelansatz aufgetragen. Um sicher zu gehen, dass die Detektion des zu untersuchenden Proteins nicht in der gesättigten Phase stattfindet, wurde für jedes zu untersuchende Protein eine separate Verdünnungsreihe erstellt. Das Abwaschen der AK („strippen“) erfolgte für 30min mit Hilfe eines Glycin Stripping-Puffers bei 50°C unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 30min mit TBS-T gewaschen und konnte mit dem AK für das Referenzprotein (GAPDH) erneut hybridisiert werden. Aus jeder Probe wurde der Quotient zu GAPDH gebildet und graphisch dargestellt.

TBS (10x):	TBS-T:	Glycin Stripping-Puffer (pH=2,0):
50mM Tris-HCl (pH7,6) 150mM NaCl	TBS (1x) 0,1% (v/v) Tween-20	1,876g Glycin 100ml 10% SDS (w/v) ad. 1l Aqua bidest.
Blockierungspuffer mit Magermilch:	Blockierungspuffer mit BSA:	
TBS (1x) 0,1% (v/v) Tween-20 5% (w/v) fettfreies Magermilchpulver	TBS (1x) 0,1% (v/v) Tween-20 5% (w/v) BSA	

2.2.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) kann die spezifische Wechselwirkung zwischen Proteinen (TF) und spezifischen DNA-Sequenzen in-vitro untersucht werden. Hierbei wird ausgenutzt, dass das radioaktiv markierte Oligonukleotid mit den entsprechenden Bindungssequenzen nach der Bindung des TF im nativen Polyacrylamid-Gel ein anderes Lauf-

verhalten als ohne gebundenes Protein zeigt. Handelt es sich dabei um eine spezifische Bandenverschiebung (*Shift*), sollte die detektierte Bande durch die Zugabe von nicht radioaktiv markiertem Oligonukleotid abgeschwächt werden. Durch die Inkubation eines spezifischen AK kann der an der DNA bindende TF identifiziert werden. Der DNA/TF Komplex wird durch den AK vergrößert und es kommt zu einer weiteren Bandenverschiebung, die als *Super-Shift* bezeichnet wird.

2.2.6.1 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden

Die radioaktive Markierung beruht auf der Phosphorylierung der 5'-Enden der synthetisierten Oligonukleotide mit radioaktivem [γ - ^{32}P]-ATP (GE Healthcare Life Science) durch eine Kinase-Reaktion. In dieser Arbeit wurden doppelsträngige Oligonukleotide markiert, so dass die synthetisierten einzelsträngigen Oligonukleotide (sense und antisense) vorher hybridisiert werden mussten. Für die Hybridisierung wurden je 25 μl (100 pmol/ μl) sense- und antisense-Oligonukleotide in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, in einem Wasserbad kurz auf 95°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Es ergab sich eine Konzentration von 50 pmol Doppelstrang-DNA/ μl . Die hybridisierten Oligonukleotide wurden à 10 μl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Markierung mit radioaktivem ^{32}P wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert (Ansatz gilt für die Markierung eines doppelsträngigen Oligos):

1 pmol doppelsträngiges Oligo
2,5 μl Kinase-Puffer (10x)
2,5 μl [γ - ^{32}P] dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ = 0,37 MBq/ μl)
1,25 μl T4-Polynukleotidkinase (10U/ μl)
ad 25 μl Aqua bidest.

Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert und die Kinase anschließend bei 65°C für 10min inaktiviert. Um die nicht eingebauten radioaktiv markierten Nukleotide von den markierten Oligonukleotiden abzutrennen, wurde der Ansatz über eine G-25 Sephadex-Säule aufgereinigt. Die Aktivität wurde mit Hilfe des Szintillationszählers (*1450 LSC & Luminescence Counter MicroBeta TriLux*) gemessen und mit Aqua bidest. auf 60.000 cpm/ μl für die Verwendung in dem EMSA eingestellt.

2.2.6.2 EMSA und Super-Shift Analysen

In Vorbereitung auf das EMSA-Experiment wurde am Vortag ein 5%iges natives Polyacrylamid-Gel (TBE-Gel) in eine Vorrichtung gegossen und $\ddot{u}N$ bei RT auspolymerisiert. Am nächsten Tag wurde das TBE-Gel während der Inkubation der Bindungsreaktion in die Laufkammer eingespannt, 500ml TBE-Puffer (1x) dazugegeben und bei einer konstanten Stromstärke von 15mA für mindestens 30min laufen gelassen. Für die Bindungsreaktion wurden folgende Komponenten in ein 1,5ml Reaktionsgefäß zusammengegeben:

8-10 μ g Zellkernextrakt aus HT1080-Zellen
 2 μ l Carrier-DNA poly [d(IC)] (1 μ g/ μ l)
 4 μ l Bindungspuffer (5x)
 1 μ l ^{32}P -oligo (60.000cpm)
 ad 20 μ l Aqua bidest.

Für die Kompetitionsexperimente wurde zusätzlich das nichtradioaktive Oligonukleotid im 150fachen molaren überschuss (150pmol) dazugegeben. Für den spezifischen Nachweis des DNA-bindenden Proteins wurden spezifische AK, die gegen Sp1, ER α und Elk-1 gerichtet waren, eingesetzt. Der spezifische AK wurde gemeinsam mit dem Zellkernextrakt für 30min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Bindungsreaktion dazugegeben und der Ansatz für 1h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte der Auftrag der Bindungsreaktion und die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe bei 150V für 2h. Das Gel wurde anschließend für 1h bei 70 $^{\circ}C$ auf einem Gelrockner (*GIBCO BRL Slab Gel Dryer, GD40/50*) der Firma Life TechnologiesTM vakuumgetrocknet und für drei Tage auf einem Phospho-Imager-Film (*BAS-IP MS 2040*) der Firma Fuji Photo Film CO.LTD bei -20 $^{\circ}C$ exponiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Scanners *Storm 860* und dem dazugehörigen Computerprogramm *STORM 4.0* der Firma Molecular Diagnostik.

5% TBE-Gel:

41,5 ml Aqua bidest.
 2,5ml TBE-Puffer (10x)
 6ml PAA
 205 μ l APS (10%)
 50 μ l TEMED

5x Bindungspuffer:

50mM Tris HCl, pH 8,0
 750mM KCl
 2,5mM EDTA
 0,5% Triton X-100 (v/v)
 62,5% Glycerin (v/v)
 1mM DTT

1x TBE-Puffer:

10xTBE-Puffer mit Aqua bidest. verdünnen

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixgene sowie deren geschlechterabhängige Regulation in kardialen Fibroblasten analysiert. Nach der Behandlung der Zellen mit E2 wurde die relative mRNA-Expression von Kollagen I und III sowie MMP2 und MMP9 mittels Real-Time-PCR gemessen. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von ER α und ER β nach E2-Behandlung untersucht. Um die E2-vermittelte Regulation der MMP2-Genexpression besser zu verstehen, wurde der Einfluss des Steroidhormons auf die Promotor-Aktivität des hMMP2-Gens näher analysiert. Mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Assays konnte der regulatorische Bereich innerhalb des hMMP2-Promotors eingegrenzt werden. Zur Identifikation der mit Hilfe computergestützter Analysen ermittelten putativen TF wurden EMSA und *Super-Shift*-Analysen durchgeführt. Untersuchungen mit dem E2-Antagonisten ICI und einem spezifischen MAPK-Inhibitor klärten, über welche Regulationsmechanismen E2 seinen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität des hMMP2-Promotors vermittelt.

3.1 Charakterisierung der isolierten kardialen Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden aus dem Myokard adulter weiblicher und männlicher Ratten (neun bis elf Wochen alt) isoliert. Anschließend wurde die Morphologie der isolierten Zellen mikroskopisch sowie die Reinheit der Zellkultur mit Hilfe spezifischer AK untersucht. Die Expression von ER α und ER β wurde mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Die spezifische Anfärbung beider ER erbrachte ihre intrazelluläre Lokalisation mit und ohne E2-Behandlung.

3.1.1 Morphologische Untersuchung der isolierten kardialen Fibroblasten

Die Morphologie der isolierten kardialen Fibroblasten wurde im Phasen-Licht-Mikroskop untersucht. In Kultur zeigten die isolierten Zellen die für Fibroblasten typische spindelförmige Gestalt¹¹⁷ und lagen in einer Einzelschicht vor. Eine Verunreinigung der Zellkultur mit kardialen Myozyten konnte durch den Mediumwechsel nach einstündiger Inkubation der frisch isolierten Zellen verhindert werden. Eine mehrschichtige Zellschicht, die typisch für VSMC ist, sowie eine für Endothelzellen typische „kopfsteinartige“ Zellschicht¹¹⁷ konnte nicht beobachtet werden. Die morphologische Betrachtung der isolierten Zellen ergab demnach einen indirekten Hinweis darauf, dass die Kultur der kardialen Fibroblasten ohne Verunreinigungen mit anderen Zelltypen vorlag.

3.1.2 Immunhistochemische Untersuchung der isolierten kardialen Fibroblasten

Eine weitere, präzisere Methode zur Bestimmung von Zelltyp und Reinheit der isolierten kardialen Fibroblasten ist die immunhistochemische Färbung. Hierfür wurden die Zellen in der zweiten Passage mit dem monoklonalen Anti-Vimentin-AK angefärbt. Dabei handelt es sich um einen typischen Fibroblasten-Marker, der mit den intermediären Filamenten der Zelle interagieren kann.¹⁶ In Abbildung (Abb.) 1A-D ist exemplarisch ein Ausschnitt aus einer gefärbten Fibroblastenkultur, die mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen wurde, dargestellt.

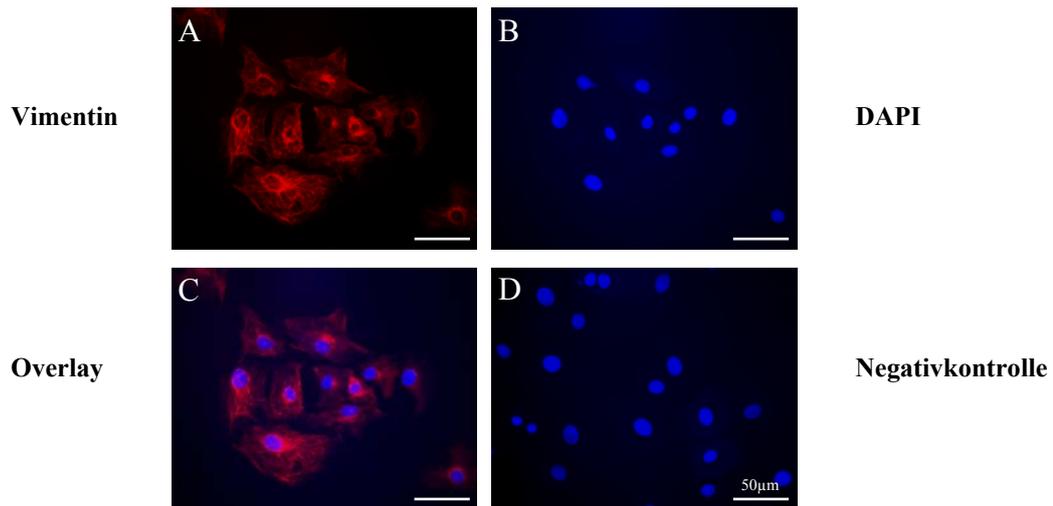


Abbildung 1A-D: Charakterisierung der isolierten kardialen Fibroblasten mittels Immunofluoreszenz. Zur Charakterisierung der isolierten kardialen Fibroblasten in der zweiten Passage wurden sie mit einem monoklonalem Primärantikörper gegen Vimentin (1:50) und dem Sekundärantikörper Cy3-red (1:50) angefärbt (Abb. 1A). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Abb. 1B). In Abb. 1C sind die Aufnahmen A und B in einem Bild gemeinsam dargestellt. In der Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit dem Sekundärantikörper Cy3-red inkubiert (Abb. 1D). Die Zellen sind in einer 40-fachen Vergrößerung dargestellt. Skalierungsbalken: 50µm

Zu erkennen sind die rot fluoreszierenden Vimentin-Fasern der angefärbten Zellen (Abb. 1A). Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden sie spezifisch mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI angefärbt (Abb. 1B). Somit konnten, durch die kombinierte Darstellung (Overlay) beider separater Aufnahmen, den mit Vimentin positiv angefärbten Zellen ihre Zellkerne zugeordnet werden (Abb. 1C). Die kombinierte Darstellung ließ dabei erkennen, dass alle in dem Ausschnitt vorhandenen Zellen mit dem Fibroblastenmarker Vimentin positiv angefärbt waren. Die Zellen der Negativkontrolle, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, zeigten nur eine blaue fluoreszierende Anfärbung der Zellkerne, jedoch kein positives Vimentin-Signal (Abb. 1D). Neben den Fibroblasten besitzen auch andere Zelltypen, vor allem Endothelzellen, intermediäre Filamente, mit denen der Anti-Vimentin-AK interagieren könnte.¹⁶ Um eine Verunreinigung der isolierten Zellen mit Endothelzellen auszuschließen, wurden sie zu-

sätzlich mit einem spezifischen AK gegen einen typischen Endothelzellenmarker, den Von Willebrand Faktor, angefärbt.¹¹⁸ Als Kontrolle diente die humane Endothelzelllinie V236, die nach der Inkubation mit diesem AK ein positives Fluoreszenzsignal zeigte. Dagegen konnte in den isolierten kardialen Fibroblasten kein Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Befunde bestätigten, dass es sich bei den mit Vimentin positiv angefärbten Zellen in Abb. 1A um kardiale Fibroblasten handelte. Da die Anfärbung der Zellen mit dem spezifischen Fibroblastenmarker Vimentin nahezu 100%ig war, konnte eine Verunreinigung der Kultur mit anderen Zelltypen ausgeschlossen werden. Somit konnte sichergestellt werden, dass die isolierten kardialen Fibroblasten einen hohen Reinheitsgrad aufwiesen.

3.1.3 Nachweis der Expression und Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von ER α und ER β

Als Voraussetzung für die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit E2 wurde zunächst mit Hilfe der PCR die mRNA-Expression der ER in den isolierten Zellen nachgewiesen. Hierbei konnte jeweils ein spezifisches PCR-Produkt für ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten gezeigt werden (Abb. 2).

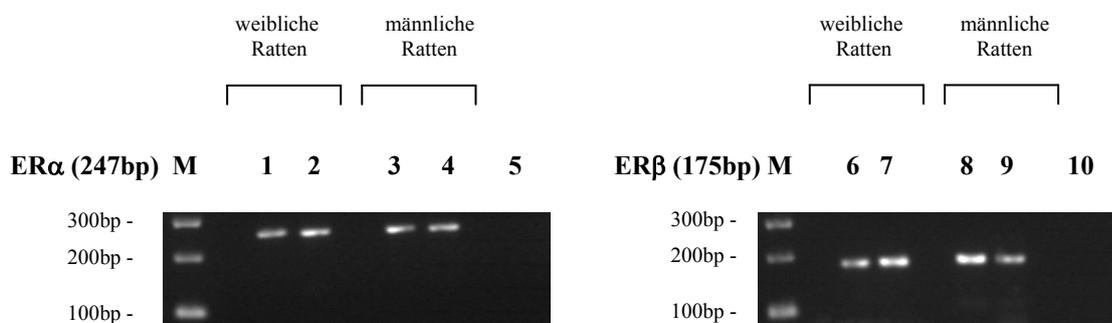


Abbildung 2: Expression von ER α und ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten. Mittels PCR wurde die Expression von ER α und ER β in den kardialen isolierten Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nachgewiesen. Die Amplifikate wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die spezifische Bande für ER α mit einer Größe von 247bp in den Zellen der weiblichen ist in Spur 1-2 und der männlichen Ratten in Spur 3-4 zu erkennen. Die spezifische Bande für ER β , mit einer Größe von 175bp, in den Zellen der weiblichen Tiere ist in Spur 6-7 und die der männlichen Ratten in Spur 8-9 zu erkennen. Die Negativkontrolle, ohne cDNA der kardialen Fibroblasten, ist in Spur 5 und 10 zu sehen. Als Marker (M) wurde der 100bp Marker der Firma Invitrogen verwendet.

Die Amplifikation von ER α ergab in den Fibroblasten der weiblichen (Spur 1-2) und männlichen Ratten (Spur 3-4) ein spezifisches Produkt mit einer Größe von 247bp. Für ER β wurde ebenfalls

ein spezifisches Amplifikat mit 175bp in den Zellen der weiblichen (Spur 6-7) und männlichen Ratten (Spur 8-9) detektiert. Die Negativkontrollen in Spur 5 und 10, ohne cDNA der kardialen Rattenfibroblasten, zeigten kein Signal.

Die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten erfolgte immunhistochemisch. Hierfür wurden die Zellen beim Umsetzen in die zweite Passage auf 8-Kammer-Objektträger verteilt und in Medium ohne Phenolrot und 10% c.s. FKS für 24h kultiviert. Anschließend wurden die Fibroblasten mit Dextrin als Kontrolle (Abb. 3A-D sowie 4A-D) oder E2 (Abb. 3E-H sowie 4E-H) für weitere 24h behandelt und anschließend mit spezifischen AK gegen ER α bzw. ER β inkubiert. Abb. 3 und Abb.4 zeigen exemplarisch die Anfärbungen der Fibroblasten aus dem Myokard einer männlichen Ratte, aufgenommen mit einem Konfokal-Laser-Mikroskop.

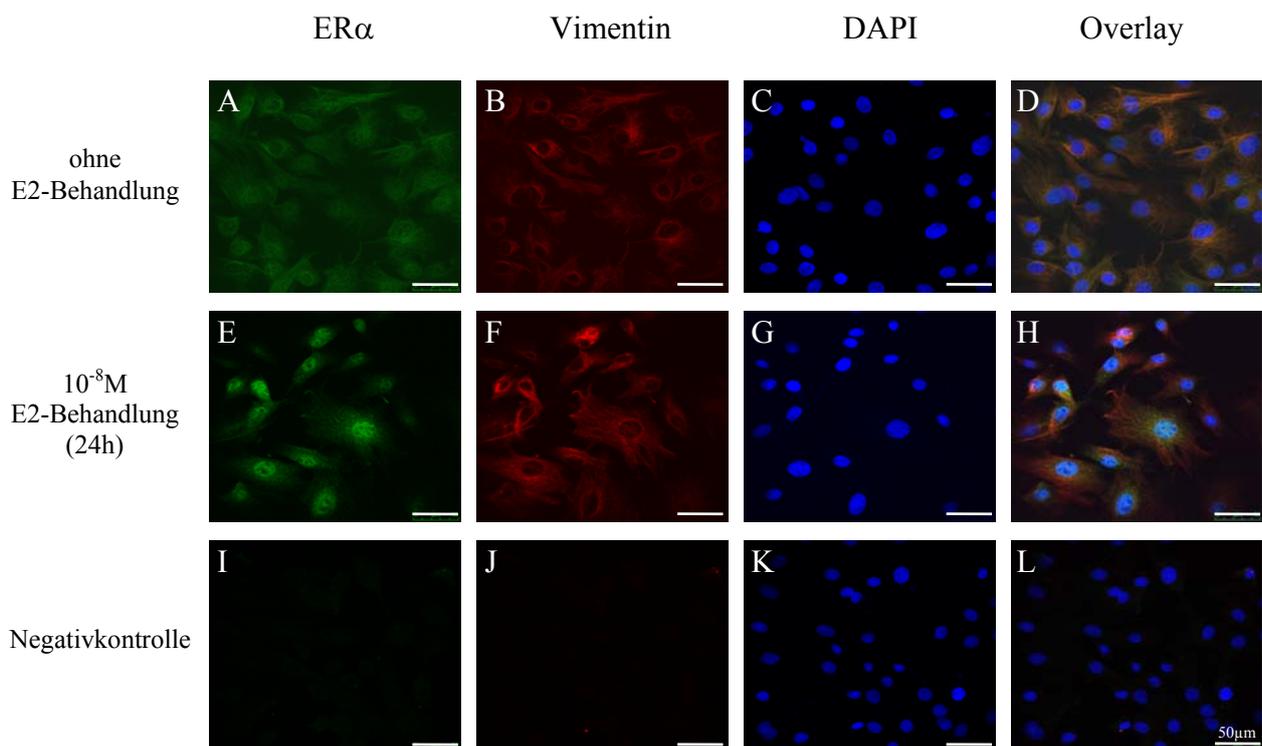


Abbildung 3A-L: Expression und Lokalisation von ER α in isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten. Abb. 3A-L zeigt die Anfärbung isolierter kardialer Fibroblasten aus männlichen Ratten in der zweiten Passage. In Abb. 3A-D wurden die Zellen mit Dextrin als Kontrolle und in Abb. 3E-H mit 10⁻⁸M E2 für 24h behandelt. Zur Detektion von ER α wurden die kardialen Fibroblasten mit einem monoklonalem Primär-AK gegen ER α (1:100) und dem Sekundär-AK FITC-green (1:50) angefärbt (Abb. 3A und E). Abb. 3B und F zeigt die Anfärbung der Zellen mit dem monoklonalen Primär-AK Vimentin (1:50) und dem Sekundär-AK Cy3-red (1:50). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Abb. 3C, G und K). In Abb. 3D sind die Aufnahmen A, B und C und in Abb. 3H sind die Aufnahmen E, F und G gemeinsam dargestellt. Abb. 3I-L zeigt die Negativkontrollen, wobei die Zellen ausschließlich mit den Sekundär-AK inkubiert wurden. Die Zellen sind in einer 40-fachen Vergrößerung dargestellt. Skalierungsbalken: 50 μ m

Die Zellen, die nicht mit E2 behandelt wurden, zeigten ER α diffus im Zytoplasma und im Nukleus verteilt (Abb. 3A). ER β wurde überwiegend im Zytoplasma der Zellen detektiert (Abb. 4A). Eine positive Anfärbung der Zellen mit dem Anti-Vimentin-AK bestätigte erneut, dass es sich bei den untersuchten Zellen um kardiale Fibroblasten handelte (Abb. 3B und Abb.4B). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Abb. 3C und 4C). Eine gemeinsame Darstellung der drei Aufnahmen zeigt, dass das detektierte ER α -Signal sowohl dem Nukleus als auch dem Zytoplasma (Abb. 3D) und das ER β -Signal dem Zytoplasma der Zellen zugeordnet werden konnte (Abb. 4D). Nach 24-stündiger Behandlung der kardialen Fibroblasten mit E2 konzentrierte sich das ER α -Signal im Nukleus und konnte nur noch in geringer Intensität im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 3E), was durch eine gemeinsame Darstellung (Abb. 3H) mit den Aufnahmen der Vimentin- (Abb. 3F) und DAPI-Färbung (Abb. 3G) bestätigt werden konnte. Für ER β war eine Zunahme der Signalintensität zu erkennen, wobei der Rezeptor nach der E2-Behandlung im Zytoplasma und im Zellkern detektiert wurde (Abb. 4E). Die gemeinsame Darstellung (Abb. 4H) mit den Bildern der Vimentin (Abb. 4F) und DAPI-Färbung (Abb. 4G) zeigte, dass das ER β -Signal dem Zytoplasma und dem Nukleus der kardialen Fibroblasten zugeordnet werden konnte. Die Negativkontrollen, in denen die Zellen ausschließlich mit den beiden Sekundär-AK behandelt wurden, zeigten nur ein Signal für DAPI (Abb. 3I-L und Abb. 4I-L).

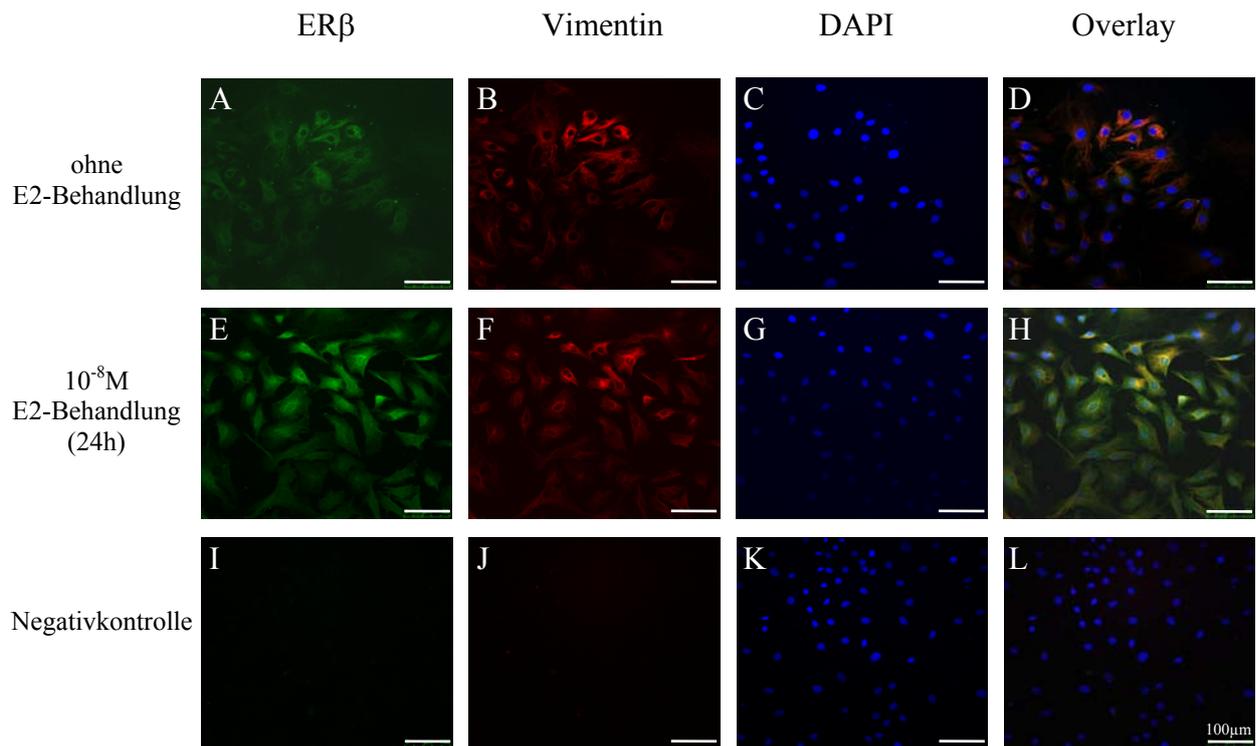


Abbildung 4A-L: Expression und Lokalisation von ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten. Abb. 4A-L zeigt die Anfärbung isolierter kardialer Fibroblasten aus männlichen Ratten in der zweiten Passage. In Abb. 4A-D wurden die Zellen mit Dextrin als Kontrolle und in Abb. 4E-H mit 10⁻⁸M E2 für 24h behandelt. Zur Detektion von ER β wurden die kardialen Fibroblasten mit einem monoklonalem Primär-AK gegen ER β (1:100) und dem Sekundär-AK FITC-green (1:50) angefärbt (Abb. 4A und E). Abb. 4B und F zeigt die Anfärbung der Zellen mit dem monoklonalen Primär-AK Vimentin (1:50) und dem Sekundär-AK Cy3-red (1:50). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Abb. 4C, G und K). In Abb. 4D sind die Aufnahmen A, B und C und in Abb. 4H sind die Aufnahmen E, F und G gemeinsam dargestellt. Abb. 4I-L zeigt die Negativkontrollen, wobei die Zellen ausschließlich mit den Sekundär-AK inkubiert wurden. Die Zellen sind in einer 20-fachen Vergrößerung dargestellt. Skalierungsbalken: 100 μ m

Die Färbung der kardialen Fibroblasten aus dem Myokard weiblicher Ratten mit den spezifischen AK gegen ER α und ER β erbrachte die gleichen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3.2 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die mRNA-Expression in kardialen Fibroblasten

Voruntersuchungen an isolierten kardialen Fibroblasten zeigten erst nach 12-stündiger Inkubation mit E2 eine Veränderung der mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene. Um den Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression von ER α und ER β sowie der extrazellulären Matrixgene zu analysieren, wurden die kardialen Fibroblasten für 12h, 24h und 48h mit E2 bzw. Dextrin (Kontrolle) behandelt. Einige Zellen wurden vor der E2-Behandlung mit dem E2-Antagonisten ICI inkubiert. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob E2 die mRNA-Expression über die ER reguliert. Die mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene wurde mittels Real-Time-PCR

quantifiziert. Dargestellt wurde die relative mRNA-Expression der gemessenen Gene, wobei die Normierung auf die mRNA-Expression von HPRT erfolgte. Der errechnete Wert für den Kontroll-Ansatz wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

3.2.1 Regulation der mRNA-Expression von ER α und ER β durch 17 β -Estradiol

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss E2 auf die mRNA-Expression von ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten hat (Abb. 5 bis Abb. 8). Dabei konnte nach 12h E2-Behandlung der kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten keine Veränderung (0,99-fach) der ER α mRNA-Expression gegenüber dem Kontrollansatz beobachtet werden (Abb. 5). Erst nach 24h zeigte sich ein signifikanter 1,49-facher Anstieg der mRNA-Expression, der auch nach 48h mit 1,29-facher Erhöhung signifikant gegenüber der Kontrolle verändert blieb. Die Inkubation der Zellen mit ICI revidierte den stimulierenden Effekt von E2. Dieser Befund weist darauf hin, dass E2 seine Wirkung auf die ER α mRNA-Expression über die ER vermittelt. Die Behandlung mit ICI verringerte die mRNA-Expression von ER α im Vergleich zur Kontrolle zu allen Zeitpunkten. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ICI einen reduzierenden Effekt auf die mRNA-Expression von ER α hat.

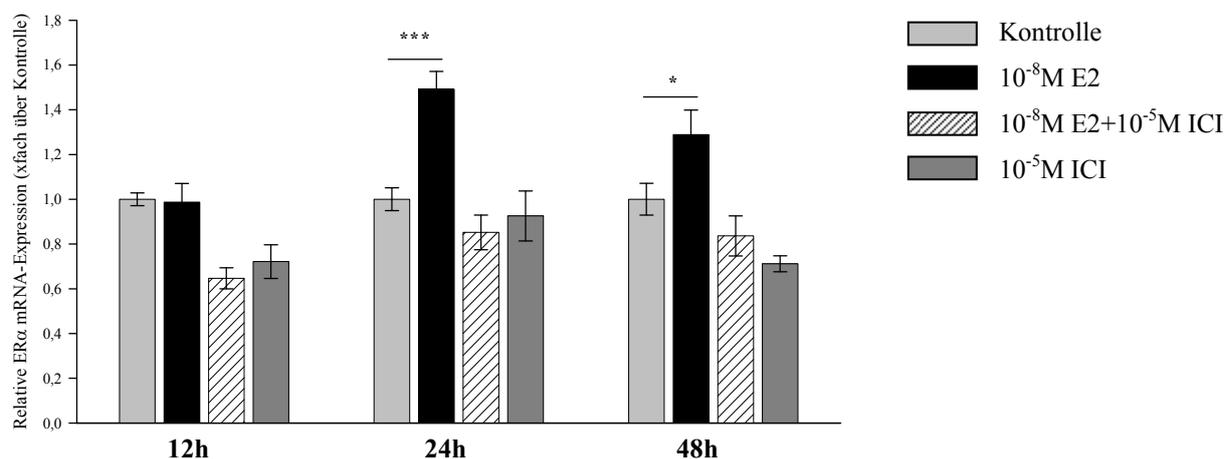


Abbildung 5: Relative mRNA-Expression von ER α in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative ER α mRNA-Expression in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten nach 12h, 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10⁻⁸M E2 (schwarz), E2 und 10⁻⁵M ICI (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Kontrollansatz wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. *** $p \leq 0,001$ und * $p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle für den jeweiligen Zeitpunkt.

Im Gegensatz zu den Zellen der weiblichen Tiere zeigte sich in den kardialen Fibroblasten aus männlichen Ratten bereits nach 12h ein signifikanter 1,39-facher Anstieg der ER α mRNA-Expression gegenüber dem Kontrollansatz (Abb. 6). Nach 24h war die ER α mRNA-Expression auf ein 1,49-faches und nach 48h auf ein 1,85-faches Niveau gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Die Blockierung der ER durch ICI hemmte den stimulierenden Effekt von E2 auf die mRNA-Expression von ER α in den Zellen der männlichen Ratten ähnlich denen der weiblichen Ratten.

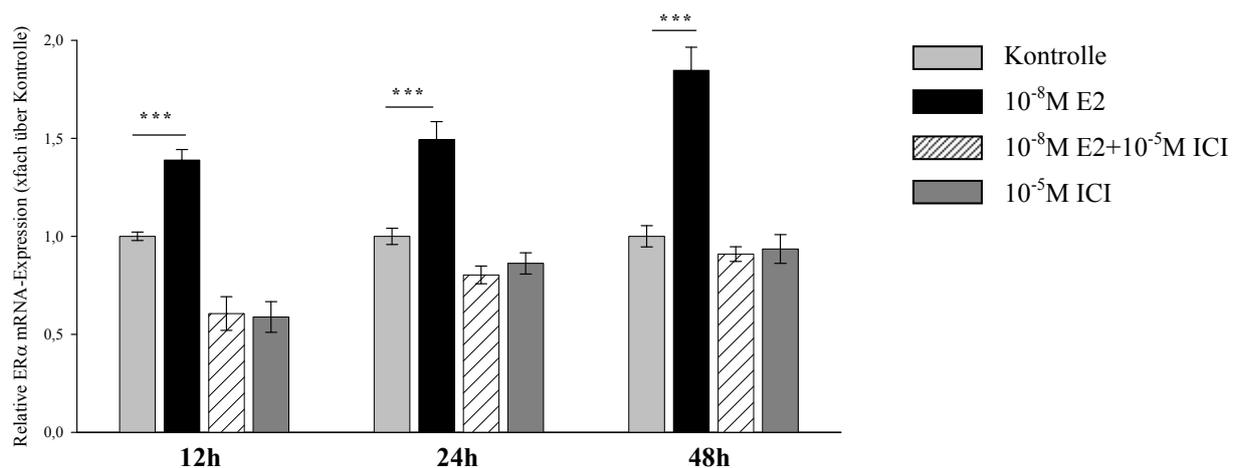


Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von ER α in isolierten kardialen Fibroblasten aus männlichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative ER α mRNA-Expression in isolierten kardialen Fibroblasten aus männlichen Ratten nach 12h, 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10⁻⁸M E2 (schwarz), E2 und 10⁻⁵M ICI (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Ansatz der Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich eingesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. *** $p \leq 0,001$ bezogen auf den Kontrollansatz des jeweiligen Zeitpunktes

Somit konnte in den Fibroblasten der männlichen Tiere bereits nach 12h ein Anstieg der ER α mRNA-Expression durch E2 gezeigt werden. Es wurde eine kontinuierliche Erhöhung der ER α mRNA-Expression nach 24h und 48h beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte in den Zellen der weiblichen Ratten die ER α mRNA-Expression erst nach 24h und 48h nachgewiesen werden. Die maximale ER α mRNA-Expression wurde nach 24h festgestellt und fiel danach wieder ab.

Für ER β konnte in den kardialen Fibroblasten der weiblichen Ratten nach 12h ein 1,34-facher signifikanter Anstieg der mRNA-Expression gegenüber dem Ansatz der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 7). Dagegen konnte nach 24h und 48h mit 1,04-fach und 1,06-fach keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle mehr beobachtet werden. Die nach 12h erhöhte

mRNA-Expression von ER β konnte durch die Inkubation mit ICI revidiert werden, was darauf hinweist, dass E2 seinen Effekt über die ER vermittelt.

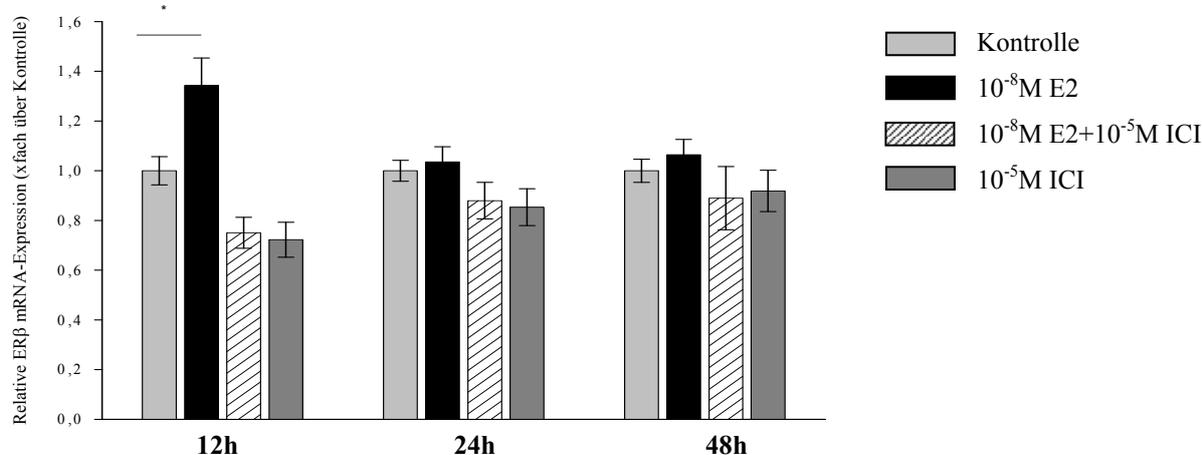


Abbildung 7: Relative mRNA-Expression von ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative ER β mRNA-Expression in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten nach 12h, 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10⁻⁸M E2 (schwarz), E2 und 10⁻⁵M ICI (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Kontrollansatz wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. * $p \leq 0,05$ bezogen auf den Ansatz der Kontrolle für den jeweiligen Zeitpunkt.

Ebenso wie in den Fibroblasten der weiblichen Ratten konnte in den Zellen der männlichen Tiere nach 12h E2-Behandlung ein signifikanter 1,23-facher Anstieg der ER β mRNA-Expression gegenüber dem Kontrollansatz gemessen werden (Abb. 8). Nach 24h war die mRNA-Expression weiterhin mit 1,28-fach signifikant erhöht, wohingegen nach 48h keine signifikante Veränderung (1,04-fach) gegenüber der Kontrolle nachzuweisen war. Der Anstieg der ER β mRNA-Expression konnte mit Hilfe von ICI blockiert werden, was darauf hinweist, dass E2 die mRNA-Expression von ER β über die ER reguliert.

Es konnte somit nach 12h ein Anstieg der ER β mRNA-Expression durch E2 in den Fibroblasten beider Geschlechter gemessen werden. In den Zellen der weiblichen Ratten war nach 24h und 48h kein Anstieg gegenüber der Kontrolle mehr zu beobachten. Wogegen in den Fibroblasten der männlichen Tiere die mRNA-Expression von ER β nach 24h erhöht blieb und erst nach 48h durch E2 nicht mehr reguliert wurde.

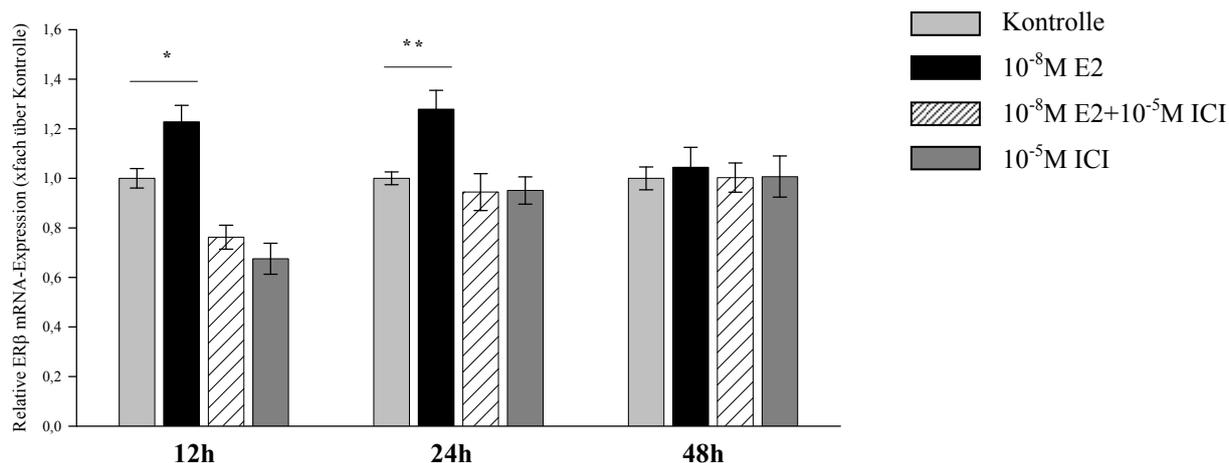


Abbildung 8: Relative mRNA-Expression von ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus männlichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative ER β mRNA-Expression in isolierten kardialen Fibroblasten aus männlichen Ratten nach 12h, 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10⁻⁸M E2 (schwarz), E2 und 10⁻⁵M ICI in (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Ansatz der Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. ** $p \leq 0,01$ und * $p \leq 0,05$ bezogen auf den Kontrollansatz für den jeweiligen Zeitpunkt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass E2 die mRNA-Expression von ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten stimuliert. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass ER α und ER β in den Zellen beider Geschlechter zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich durch E2 reguliert werden. Der stimulierende Effekt von E2 konnte mittels ICI revidiert werden, was einen Hinweis darauf liefert, dass die Regulation über die ER vermittelt wird.

3.2.2 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die mRNA-Expression extrazellulärer Matrixgene

Um den Einfluss von E2 auf das kardiale Remodeling, sowie beobachtete geschlechterabhängige Unterschiede besser zu verstehen, wurde die Expression der extrazellulären Matrixgene Kollagen I und III sowie MMP2 und MMP9 untersucht.

Nach 12h E2-Behandlung konnte keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von Kollagen I und III sowie MMP2 und MMP9 gemessen werden. Für MMP9 wurde erst nach 48h eine signifikante Änderung der mRNA-Expression durch die Behandlung mit E2 beobachtet. Aus diesem Grund wurden die Messwerte für Kollagen I, III und MMP2 nach 12h und für MMP9 nach 12h und 24h nicht graphisch dargestellt (Abb. 9 bis Abb. 12).

3.2.2.1 Regulation der Kollagen I und III mRNA-Expression

Nach der E2-Behandlung der kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten zeigte sich nach 24h eine signifikante Reduktion der Kollagen I mRNA-Expression auf ein 0,67-faches und nach 48h auf ein 0,82-faches Niveau gegenüber der Kontrolle (Abb.9A).

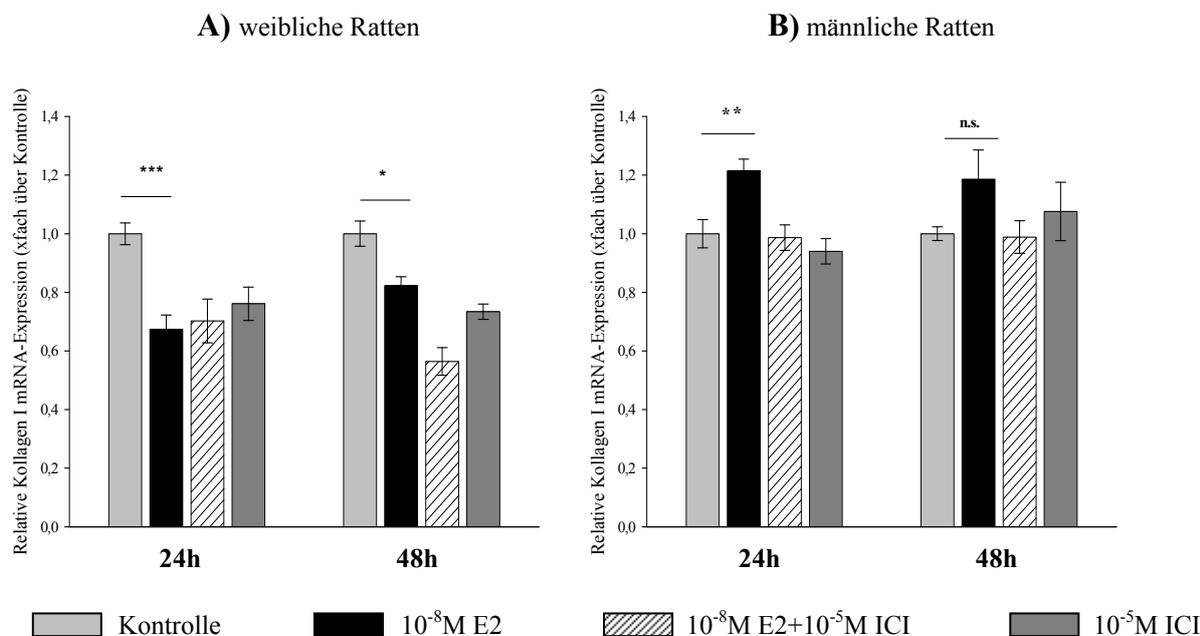


Abbildung 9A-B: Relative mRNA-Expression von Kollagen I in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von Kollagen I in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen (Abb. 9A) und männlichen Ratten (Abb. 9B) nach 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10⁻⁸M E2 (schwarz), E2 und 10⁻⁵M ICI (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n≥3), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Kontrollansatz wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. ***p≤0,001, **p≤0,01, *p<0,05 gegenüber der Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes.

Zu beiden Zeitpunkten hob ICI die durch E2 hervorgerufene Reduktion nicht auf. In den ausschließlich mit ICI behandelten Zellen zeigte sich ebenfalls eine reduzierte mRNA-Expression von Kollagen I gegenüber der Kontrolle. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ICI eine agonistische Wirkung auf die Kollagen I mRNA-Expression hat. Ebenso ist es möglich, dass E2 seine Wirkung ER-unabhängig in den kardialen Fibroblasten der weiblichen Ratten vermittelt. Im Gegensatz dazu konnte 24h nach E2-Behandlung der Fibroblasten aus dem Myokard männlicher Ratten ein 1,21-facher signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen I gegenüber der Kontrolle gemessen werden (Abb. 9B). Nach 48h war die Expression der Kollagen I mRNA tendenziell erhöht, erreichte aber mit einem 1,19-fachen Anstieg gegenüber der Kontrolle kein

Signifikanzniveau. ICI zeigte in den Zellen der männlichen Tiere eine antagonistische Wirkung und revidierte die stimulierende Wirkung von E2 auf die Kollagen I mRNA-Expression.

Wie bereits für Kollagen I nachgewiesen, wurde auch die Kollagen III mRNA-Expression in den kardialen Fibroblasten der weiblichen Ratten nach E2-Behandlung reduziert (Abb. 10A).

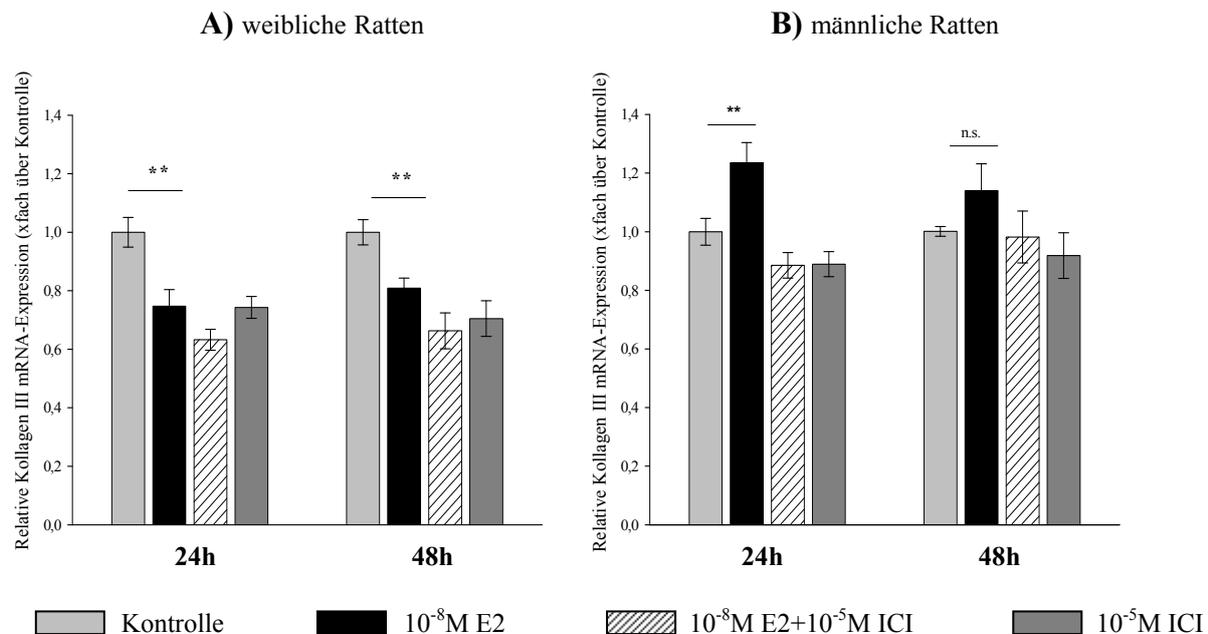


Abbildung 10A-B: Relative mRNA-Expression von Kollagen III in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von Kollagen III in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen (Abb. 10A) und männlichen Ratten (Abb. 10B) nach 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10⁻⁸M E2 (schwarz), E2 und 10⁻⁵M ICI (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n≥3), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Kontrollansatz wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. **p≤0,01 bezogen auf den Ansatz der Kontrolle für den jeweiligen Zeitpunkt.

Nach 24h konnte mit 0,75-fach und nach 48h mit 0,81-fach eine signifikant reduzierte mRNA-Expression von Kollagen III im Vergleich zu den Kontrollansätzen gemessen werden. Durch die Behandlung der Zellen mit ICI wurde der Einfluss von E2 zu beiden Zeitpunkten nicht revidiert. Ebenso zeigten die Ansätze, die ausschließlich mit ICI behandelt wurden, eine Reduktion der Kollagen III mRNA-Expression. Wie bereits bei Kollagen I vermutet, könnte dieser Befund bedeuten, dass ICI eine agonistische Wirkung auf die Kollagen III mRNA-Expression hat. Ebenfalls wäre es möglich, dass E2 seine Wirkung ER-unabhängig in den Zellen der weiblichen Ratten vermittelt. Dagegen konnte in den kardialen Fibroblasten der männlichen Ratten ein Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen III beobachtet werden (Abb. 10B). Nach 24h E2-Behandlung kam es zu einem signifikanten 1,23-fachen Anstieg der mRNA-Expression ge-

genüber der Kontrolle. Die Expression blieb nach 48h mit einem 1,14-fachen Anstieg tendenziell erhöht, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau mehr. ICI hob den Effekt von E2 sowohl nach 24h als auch nach 48h auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass E2 nach 24h und 48h Behandlung der kardialen Fibroblasten einen regulierenden Einfluss auf die mRNA-Expression von Kollagen I und III hat. Dabei konnte eine geschlechterabhängige Regulation beobachtet werden, wobei es in den kardialen Fibroblasten der weiblichen Ratten zu einer Reduktion und in den Fibroblasten der männlichen Ratten zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von Kollagen I und III kam. Der Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression beider Kollagen Gene konnte nur in den isolierten Fibroblasten aus männlichen Ratten durch ICI blockiert werden.

3.2.2.2 Regulation der MMP2 und MMP9 mRNA-Expression

Die mRNA-Expression von MMP2 der kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten war nach 24h mit 0,84-fach und 48h mit 0,85-fach gegenüber den Kontrollansätzen durch E2 signifikant reduziert (Abb. 11A).

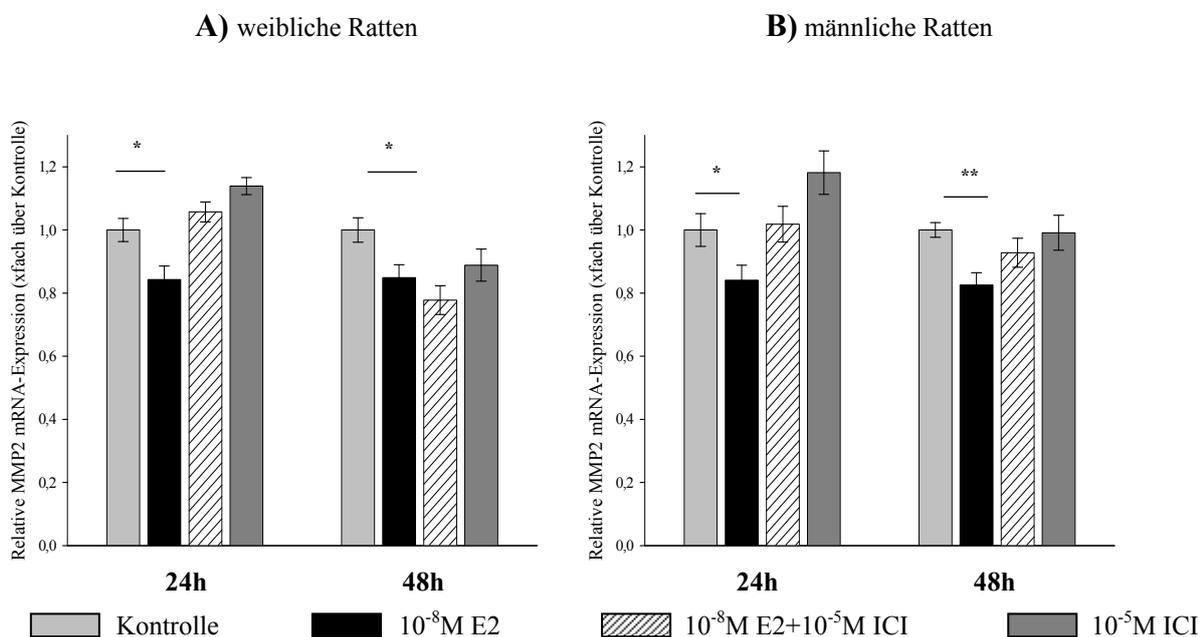


Abbildung 11A-B: Relative mRNA-Expression von MMP2 in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von MMP2 in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen (Abb. 11A) und männlichen Ratten (Abb. 11B) nach 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10^{-8} M E2 (schwarz), E2 und 10^{-5} M ICI (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Ansatz der Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ bezogen auf den Kontrollansatz für den jeweiligen Zeitpunkt.

Durch die Inkubation der Zellen mit ICI konnte der E2-Effekt nach 24h revidiert werden, jedoch nicht mehr nach 48h. Die ausschließlich mit ICI behandelten Zellen zeigten nach 48h ebenfalls eine geringere MMP2 mRNA-Expression gegenüber dem Ansatz der Kontrolle. Eine signifikante Reduktion der MMP2 mRNA-Expression durch E2 nach 24h auf ein 0,84-faches und 48h auf ein 0,83-faches gegenüber den Ansätzen der Kontrolle, konnte ebenso in den isolierten Zellen aus männlichen Ratten beobachtet werden (Abb. 11B). Durch die Behandlung der Zellen mit ICI wurde dieser inhibitorische Effekt aufgehoben. Damit konnte ein Hinweis geliefert werden, dass E2 seine reduzierende Wirkung auf die MMP2 mRNA-Expression über die ER vermittelt.

Nach 48h E2-Behandlung konnte eine reduzierte MMP9 mRNA-Expression in den kardialen Fibroblasten gemessen werden (Abb. 12). In den Zellen der weiblichen Ratten kam es zu einer signifikanten Reduktion auf das 0,72-fache gegenüber der Kontrolle (Abb. 12A) und in den Fibroblasten der männlichen Tiere wurde mit 0,77-fach gegenüber dem Kontrollansatz ebenso eine signifikante Reduktion gemessen (Abb. 12B).

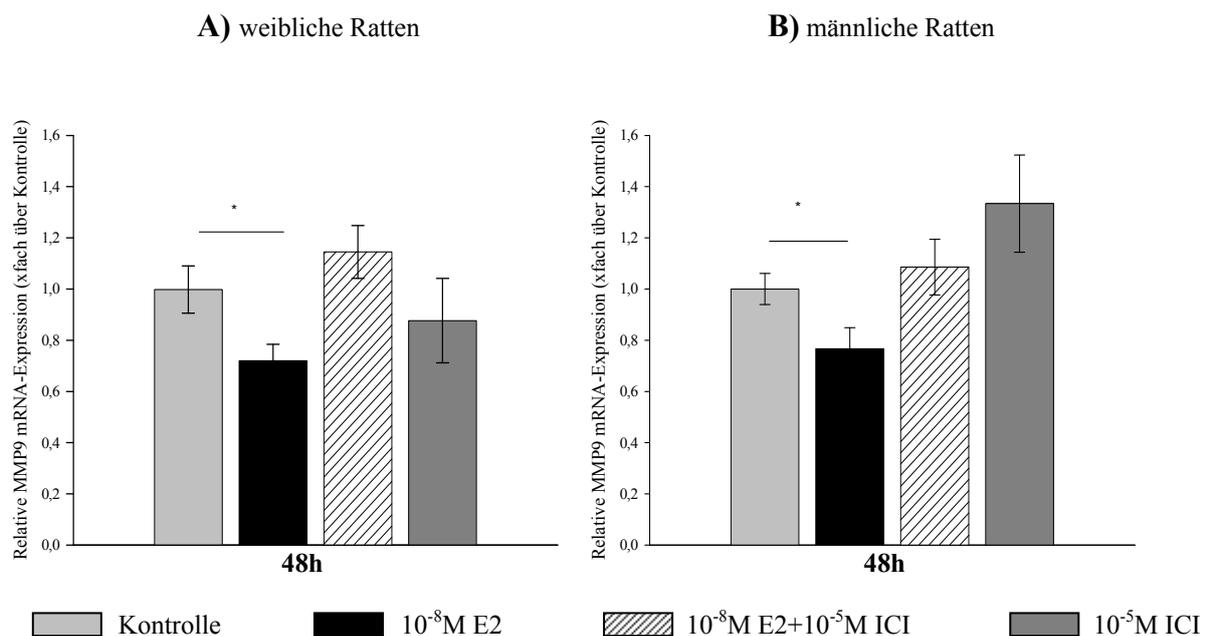


Abbildung 12A-B: Relative mRNA-Expression von MMP9 in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von MMP9 in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen (Abb. 12A) und männlichen Ratten (Abb. 12B) nach 24h und 48h Behandlung mit Dextrin als Kontrolle (hellgrau), 10⁻⁸M E2 (schwarz), E2 und 10⁻⁵M ICI (gestreift) und ICI (dunkelgrau). Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n=3), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Ansatz der Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. *p \leq 0,05 bezogen auf den Kontrollansatz für den jeweiligen Zeitpunkt.

Die reduzierende Wirkung von E2 auf die mRNA-Expression von MMP9 konnte durch ICI revidiert werden. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis darauf, dass E2 seine Wirkung auf die MMP9 mRNA-Expression in den Zellen der weiblichen und männlichen Ratten über die ER vermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass E2 einen supressorischen Einfluss auf die mRNA-Expression von MMP2 und MMP9 hat. Im Gegensatz zu Kollagen I und III wird die mRNA-Expression beider MMP Gene nicht geschlechterabhängig durch E2 reguliert. Durch die Blockierung der ER mit Hilfe des E2-Antagonisten ICI konnte der inhibitorische Effekt von E2 revidiert werden, was darauf hinweist, dass die ER an der Regulation beteiligt sind.

3.3 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2-Promotors in HT1080-Zellen

Um den Einfluss von E2 auf die Aktivität des hMMP2-Promotors zu untersuchen, wurden im Vorfeld die Transfektions- und Stimulationsbedingungen für die HT1080-Zellen optimiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 1 μ g pS2-pGL3 Reporter-Konstrukt für 24h transfiziert und anschließend für 24h mit E2 und Dextrin als Kontrolle behandelt. Das Reporter-Konstrukt trägt vor dem Luciferase (Luc)-Gen den Promotor des pS2-Gens mit funktionellem ERE und stellt damit eine Zielsequenz für beide ER dar.¹¹⁹ Aus diesem Grund eignete es sich als Kontrolle zur Detektion von E2-Effekten. Der pGL3-Basic-Vektor ohne Promotor diente dabei als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Behandlung mit E2 wurden parallel MCF-7 Zellen transfiziert und ebenfalls mit E2 behandelt. Untersuchungen mit dieser ER α und ER β überexprimierenden Zelllinie¹²⁰ zeigten einen Anstieg der Luc-Aktivität des pS2-pGL3-Konstrukts durch E2.

Die Ergebnisse der ersten Transfektion des pS2-pGL3-Konstrukts in HT1080-Zellen zeigten keine Erhöhung der Luc-Aktivität nach E2-Behandlung. Zur Absicherung wurden ER α und ER β in beiden Zelllinien quantifiziert und nachgewiesen, wobei gezeigt werden konnte, dass die Expression beider ER in den HT1080-Zellen deutlich geringer war als in den MCF-7 Zellen (Daten nicht gezeigt). Experimentell ähnlich aufgebaute Arbeiten, die ebenfalls E2-*responsive* Plasmide transfizierten, detektierten erst nach der Kotransfektion mit den Expressionskonstrukten für die ER eine Antwort auf E2. Dieser Effekt kann auf den limitierten Anteil an ER in den transfizierten Zellen, die das Luc-Reporter-Konstrukt überexprimieren, zurückgeführt werden.¹²¹ Demzufolge wurde das pS2-pGL3-Konstrukt gemeinsam mit einer ansteigenden Konzentration

(10, 100, 500 und 1000ng) des Expressionskonstruktes für den humanen ER α (hESR1-pSG5) in die HT1080-Zellen kotransfiziert. Dabei diente der leere pSG5-Vektor ohne die kodierende Sequenz für ER α als Negativkontrolle. In allen Kotransfektionsexperimenten konnte eine erhöhte Luc-Aktivität des pS2-pGL3-Konstruktes nach der Stimulation mit E2 beobachtet werden, wobei der größte Anstieg gegenüber dem pS2-pGL3 Konstrukt ohne hESR1-pSG5 bei einer Konzentration von 500ng zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Diese Menge wurde in alle nachfolgenden Transfektionsversuche eingesetzt. Darüber hinaus zeigten unterschiedliche Konzentrationen an c.s FKS (2,5%, 5% und 10%) eine unterschiedlich starke Luc-Aktivität des pS2-pGL3-Konstruktes nach E2 Behandlung. Die höchste Luc-Aktivität des pS2-pGL3-Konstruktes zeigte sich bei der Kultivierung und Transfektion mit 10% c.s FKS und E2-Behandlung mit 2,5% c.s FKS (Daten nicht dargestellt). Diese Bedingungen wurden für die darauffolgenden hMMP2-Promotor-Analysen beibehalten.

Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde jeweils das Renilla-Konstrukt (pHRL-TK) kotransfiziert. Die Ermittlung der Grundaktivität der HT1080-Zellen erfolgte bei jedem Versuch durch einen nichttransfizierten Ansatz. Nach Messung der Luc-Aktivität der einzelnen Expressionskonstrukte wurde der errechnete Wert für den Kontrollansatz jedes hMMP2-Prom-Konstruktes gleich Eins gesetzt und der Wert der E2-Behandlung darauf bezogen. Der als Positivkontrolle verwendete pS2-pGL3-Vektor zeigte nach E2-Behandlung eine drei- bis fünffache Erhöhung der Luc-Aktivität gegenüber der Kontrolle in allen Versuchen. Die Kotransfektion des hMMP2-417-pGL2-Konstruktes mit leerem pSG5-Vektor zeigte keine Veränderung der Luc-Aktivität durch die Behandlung mit E2 gegenüber der Kontrolle. Der leere pSG5-Vektor hatte demnach keinen Einfluss auf die beobachteten Effekte. Für eine bessere Übersicht in der graphischen Darstellung wurde auf die Abbildung beider Kontrollen sowie auf die des pGL2-Vektors als Negativkontrolle für die hMMP2-Prom-Konstrukte verzichtet.

3.3.1 Wirkung von 17 β -Estradiol auf die humane MMP2-Promotor-Aktivität

Um den Einfluss von E2 auf die Promotor-Aktivität des hMMP2-Gens näher zu analysieren, wurden die Expressionskonstrukte hMMP2-324-, 417-, 708-, 957- und 1168-pGL2 in die Transfektions- und Stimulationsexperimente eingesetzt (Abb.13 sowie Tab. 8 in Kapitel 2.1.10). Des Weiteren wurde untersucht, welche Bedeutung die 5' UTR (*untranslated region*) bei der Regulation der hMMP2-Prom-Aktivität durch E2 hat. Zu diesem Zweck wurde das hMMP2-708/k-pGL2-Konstrukt zusätzlich mit in die Transfektionsexperimente eingesetzt. Das

Konstrukt umfasst den gleichen Promotorbereich wie das hMMP2-708-pGL2-Konstrukt, schließt jedoch den Bereich der 5'UTR aus und ist mit der Abkürzung „k“ (für verkürzte Version) gekennzeichnet (Abb. 13 sowie Tab. 8 in Kapitel 2.1.10).

Die Behandlung der transfizierten HT1080-Zellen mit E2 reduzierte die Promotor-Aktivität aller Expressionskonstrukte gegenüber dem Kontroll-Ansatz signifikant (Abb. 13). Die Konstrukte hMMP2-708-pGL2 sowie hMMP2-1168-pGL2 präsentierten dabei die geringste (0,69-fach) und das hMMP2-957-pGL2-Konstrukt die stärkste (0,54-fach) Reduktion der Luc-Aktivität. Das hMMP2-708/k-pGL2-Konstrukt ohne 5'UTR zeigte mit einer 0,64-fachen Luc-Aktivität ebenfalls eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigt somit, dass der 5'UTR Bereich des hMMP2-Promotors keine Rolle bei der E2 vermittelten Reduktion der hMMP2 Promotor-Aktivität spielt. Die regulatorische Region konnte durch den Einsatz aller Expressionskonstrukte auf den Bereich von -324bp bis -260bp (relativ zum Translationsstart +1bp) eingegrenzt werden.

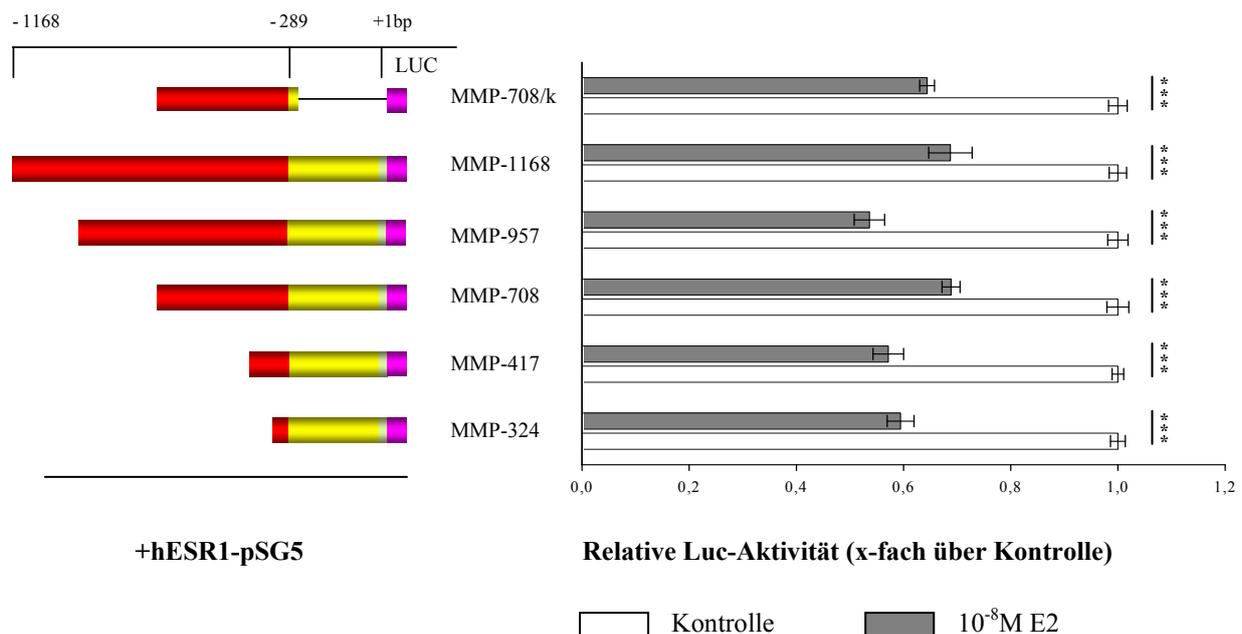


Abbildung 13: Relative Luc-Aktivität der hMMP2-Promotor-Konstrukte nach E2-Behandlung. Zu erkennen sind die Expressionskonstrukte mit den unterschiedlich langen Promotorbereichen des hMMP2-Gens (rot, relativ zum Translationsstart +1bp), dem Bereich der 5'UTR (gelb von -289bp bis +1bp), Exon 1 (hellgelb von +1bp bis +18bp) und dem Luc-Gen (lila). Das hMMP2-780/k-pGL2 Konstrukt, das den Bereich der 5'UTR ausschließt, ist mit einem „k“ gekennzeichnet. Die verschiedenen hMMP2-Prom-Konstrukte wurden mit 500ng hESR1-pSG5 in HT1080-Zellen für 24h kotransfiziert. Anschließend erfolgte die 24h Behandlung der Zellen mit Dextrin als Kontrolle (weiß) oder 10⁻⁸M E2 (grau). Die Luc-Aktivität wurde mit Hilfe des Luc-Reporter-Assays gemessen. Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n≥3), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Kontrollansatz jedes einzelnen Konstruktes wurde gleich Eins gesetzt, der ermittelte Wert für E2 wurde darauf bezogen. ***p≤0,001 gegenüber dem Ansatz der Kontrolle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass E2 in Abhängigkeit von ER α einen inhibitorischen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des hMMP2-Promotors hat. Dabei übt E2 seine regulatorische Wirkung über die Region zwischen -324bp und -260bp (relativ zum Translationsstart +1bp) der hMMP2-Promotor-Sequenz aus.

3.3.2 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Aktivität des humanen MMP2-Promotors in Abhängigkeit der ER

Um zu bestätigen, dass der reduzierende Effekt von E2 auf die hMMP2-Promotor-Aktivität über ER α vermittelt wird, wurde der E2-Antagonist ICI in die Transfektions- und Stimulationsexperimente mit eingesetzt.

Die reduzierte Luc-Aktivität nach E2-Behandlung konnte für alle hMMP2-Prom-Konstrukte durch ICI aufgehoben werden. Exemplarisch für alle Expressionskonstrukte ist die gemessene Luc-Aktivität des hMMP2-417-pGL2 Konstruktes dargestellt (Abb. 14).

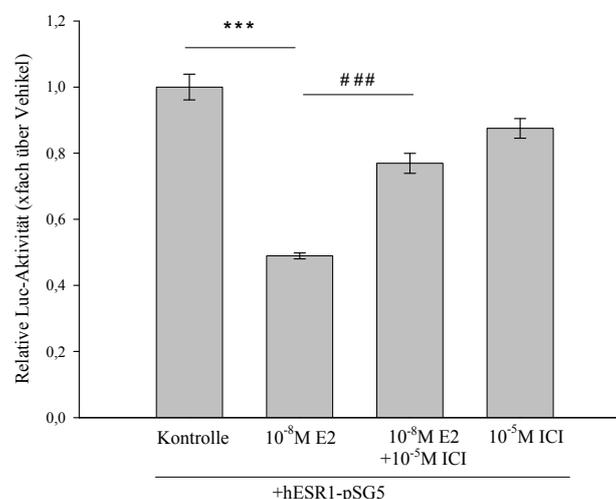


Abbildung 14: Relative Luc-Aktivität des hMMP2-417-pGL2 Konstrukt nach E2- und ICI-Behandlung. Das hMMP2-417-pGL2 Konstrukt wurde gemeinsam mit 500ng hESR1-pSG5 für 24h in HT1080-Zellen kotransfiziert. Anschließend erfolgte die 24h Behandlung der Zellen mit Dextrin als Kontrolle, 10⁻⁸M E2, E2 und 10⁻⁵M ICI und ausschließlich ICI. Die Luc-Aktivität wurde mit Hilfe des Luc-Reporter-Assays gemessen. Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n=3), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Ansatz der Kontrolle wurde gleiche Eins gesetzt, die restlichen Werte wurden darauf bezogen. ***p \leq 0,001 gegenüber dem Kontrollansatz und ###p \leq 0,001 bezogen auf den Ansatz mit E2.

In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten wurde die Luc-Aktivität auf ein 0,49-faches, im Vergleich zu dem Kontrollansatz, durch die Behandlung der Zellen mit E2 signifikant reduziert. Die gemeinsame Behandlung der Zellen mit E2 und ICI zeigte einen signifikanten Anstieg der Luc-Aktivität des hMMP2-417-pGL2-Konstruktes gegenüber dem Ansatz mit E2 und weist damit die Beteiligung von ER α an der inhibitorischen Wirkung von E2 auf die transkriptionelle Aktivität des hMMP2-Promotors nach.

3.4 Analyse und Identifikation cis- und trans-aktiver Elemente des humanen MMP2-Promotors

Wie in Abb. 13 dargestellt, scheint die Region zwischen -324bp bis -260bp (relativ zum Translationsstart +1bp) innerhalb des hMMP2-Promotors für den supressorischen Effekt von E2 auf die hMMP2-Promotor Aktivität in Abhängigkeit von ER α verantwortlich zu sein. Die weitere Untersuchung der eingegrenzten regulatorischen hMMP2-Promotorregion auf putative cis- und trans-aktive Elemente erfolgte mit Hilfe computergestützter Analysen mit drei verschiedenen Datenbanken. EMSA und *Super-Shift* Analysen wurden durchgeführt, um die ermittelten putativen Bindungsstellen näher zu charakterisieren sowie deren bindende TF zu identifizieren.

3.4.1 Computergestützte Analyse zur Identifikation putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Die computergestützten Analysen der eingegrenzten Region, die mit den Programmen *MatInspector*, *TESS* und *AliBaba2.1* durchgeführt worden sind, zeigten zahlreiche Bindungsstellen für mehrere putative TF. Aufgrund der vorangegangenen Versuche mit E2 und ER α wurde gezielt nach putativen TF gesucht, deren Interaktion mit ER α bekannt ist oder deren Expression und transkriptionelle Aktivität durch E2 moduliert werden kann. Die ermittelten putativen Bindungsstellen der ausgewählten TF innerhalb der hMMP2-Promotorsequenz wie Sp1, NF-1, Elk-1 und c-ETS-1 sind in Abb. 15 dargestellt.

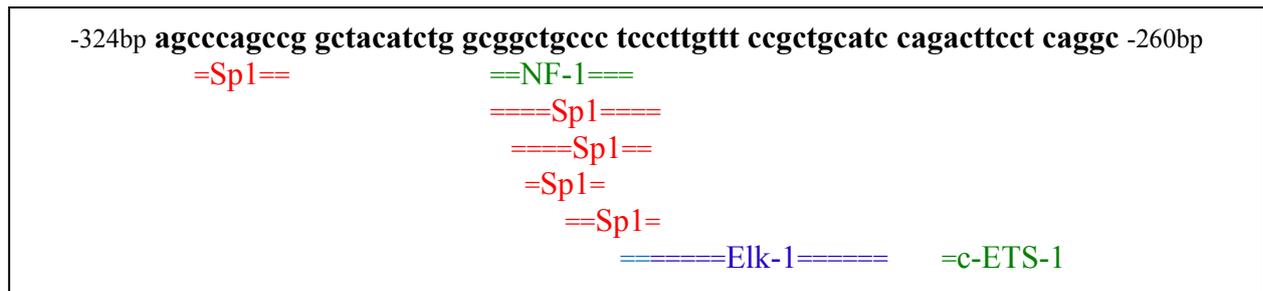


Abbildung 15: Darstellung der eingegrenzten Sequenz des humanen MMP2-Promotors und der putativen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren. Die hMMP2-Promotorsequenz (-324/-260bp in Bezug zum Translationsstart +1bp) wurde mit Hilfe der Programme *MatInspector*, *TESS* und *AliBaba2.1* auf die Bindung putativer Transkriptionsfaktoren analysiert. Eingezeichnet sind die ermittelten putativen Bindungsstellen für die TF Sp1, NF-1, Elk-1 und c-ETS-1.

3.4.2 Identifikation bindender Transkriptionsfaktoren mittels EMSA und Super-Shift-Methode

Der Abschnitt zwischen -324bp und -260bp des hMMP2-Promotors wurde mittels der EMSA und der *Super-Shift*-Analyse genauer untersucht, um die an den potentiellen Bindungsstellen bindenden TF zu identifizieren. Dafür wurden unterschiedlich lange, den zu untersuchenden Bereich abdeckende, Oligonukleotide (Oligos) synthetisiert (Abb. 16). Das Oligo mit der Bezeichnung „Ganzer Bereich“ umfasst den größten Teil der eingegrenzten Promotorregion zwischen -315bp und -266bp mit den putativen Bindungsstellen für NF-1, 4xSp1, Elk-1 sowie dem Bindungsmotiv für c-ETS-1. Das Oligo mit der Bezeichnung „Vorderer Bereich“ umspannt den Bereich von -324bp bis -287bp mit den stromaufwärts gelegenen putativen Bindungsstellen für Sp1, NF-1 und vier weitere Sp1-Faktoren. Das „Elk-1“ Oligo beinhaltet den Bereich von -296bp bis -256bp mit den putativen Bindungsstellen für Elk-1 und c-ETS-1.

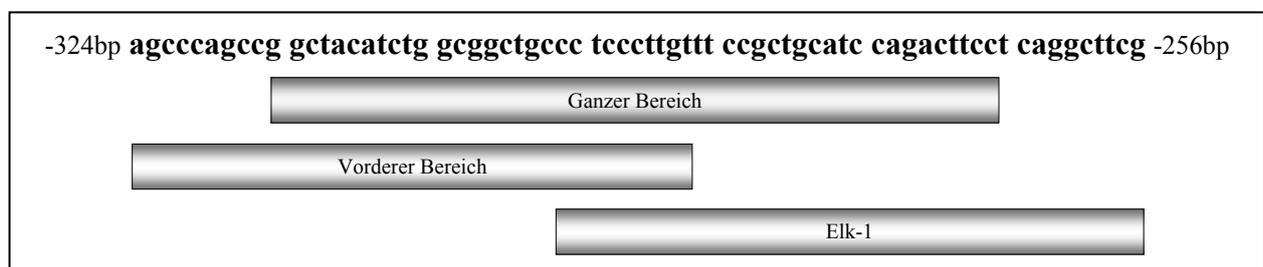


Abbildung 16: Lage der synthetisierten Oligonukleotide innerhalb der eingegrenzten hMMP2-Promotor-Region von -324bp bis -256bp (in Bezug zum Translationsstart +1bp). Dargestellt ist die Lage der unterschiedlichen Oligos. Das Oligo „Ganzer Bereich“ umfasst von -315bp bis -266bp den größten Teil der eingegrenzten Promotorregion. Das Oligo „Vorderer Bereich“ umspannt den Bereich von -324bp bis -287bp und das „Elk-1“ Oligo umfasst den Bereich von -296bp bis -256bp.

In Vorbereitung auf die Analysen wurde Zellkernextrakt aus HT1080-Zellen isoliert, die zuvor mit hESR1-pSG5 transfiziert und mit Dextrin, E2 und einer Kombination aus E2 und ICI behandelt wurden. Das Zellkernextrakt wurde gemeinsam mit den verschiedenen ^{32}P -markierten Oligos inkubiert. Der Nachweis der spezifischen Bindung des Zellkernextrakts an das radioaktiv markierte Oligo wurde durch die Zugabe eines unmarkierten Oligo im 150-fachen molaren Überschuss gesichert. Die Identifikation der gebundenen TF erfolgte mit spezifischen gegen die gesuchten TF gerichteten AK.

3.4.2.1 Untersuchung putativer Bindungsstellen im Bereich von -342bp bis -266bp des humanen MMP2-Promotors

Zur Identifikation der am hMMP2-Promotor bindenden TF wurde der eingegrenzte Promotorbereich zunächst mit Hilfe des Oligo „Ganzer Bereich“ näher untersucht. Nach der Inkubation des ^{32}P -markierten Oligo mit isoliertem Zellkernextrakt aus HT1080-Zellen, die für 24h mit Dextrin behandelt wurden, zeigten sich drei spezifische Banden. Eine Inkubation des Oligo mit Zellkernextrakt aus Zellen, die ebenso lange mit E2 behandelt wurden, führte zu einer stärkeren Signalintensität der oberen Bande (nicht dargestellt). Zur weiteren Eingrenzung des hMMP2-Promotor-Bereiches mit dem verstärkten Bandensignal nach E2-Behandlung wurde das EMSA-Experiment mit dem radioaktiv markierten Oligo „Vorderer Bereich“ wiederholt. Die Inkubation des Oligo erfolgte mit Zellkernextrakt aus mit Dextrin, E2 und einer Kombination aus E2 und ICI behandelten Zellen (Abb. 17).

Nach der gemeinsamen Inkubation des ^{32}P -markierten Oligo „Vorderer Bereich“ mit dem Zellkernextrakt aus Dextrin behandelten HT1080-Zellen wurden drei Banden detektiert (Bande I, II und III). Dabei handelte es sich um eine spezifische Bindung der Kernproteine an das Oligo, da die Banden durch die Konkurrenz mit unmarkiertem Oligo verdrängt werden konnten (Spur 2). Wurde das ^{32}P -markierte Oligo mit Zellkernextrakt aus E2-behandelten HT1080-Zellen inkubiert, konnte ein verstärktes Signal der oberen Bande detektiert werden (Bande I, Spur 3 mit rotem Pfeil gekennzeichnet). Alle drei Banden ergaben sich aus spezifischen Wechselwirkungen des Zellkernextrakts mit dem Oligo, da sie sich durch die Zugabe von unmarkiertem Oligo verdrängen ließen (Spur 4). Die Inkubation des radioaktiv markierten Oligo „Vorderer Bereich“ mit dem Zellkernextrakt aus E2 und ICI behandelten HT1080-Zellen zeigte ebenfalls drei Banden, wobei das Signal der oberen Bande gegenüber dem Ansatz mit E2 schwächer war, bzw. fast ganz verschwunden war (Spur 5). Die Spezifität der Banden wurde durch die Inkubation mit einem Überschuss an unmarkiertem Oligo bestätigt (Spur 6). Um auszuschließen, dass es sich bei

den detektierten Banden um ungebundenes ^{32}P -markiertes Oligo handelte, wurde das ^{32}P -markierte Oligo „Vorderer Bereich“ als Negativkontrolle aufgetragen (Spur 7). Dieser Ansatz zeigte lediglich ein Signal auf der Höhe der freien Probe und bestätigte somit die Spezifität der detektierten Banden.

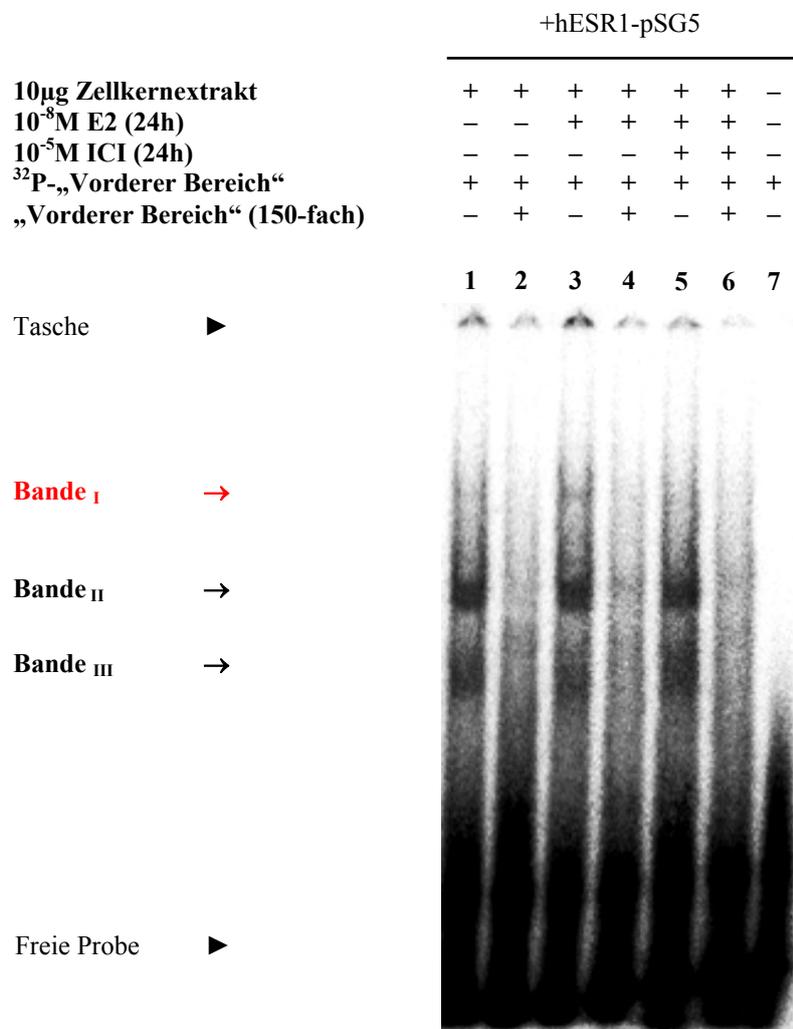


Abbildung 17: Analyse der putativen Bindungsstellen von -324bp bis -287bp innerhalb des hMMP2 Promotors. Das Oligo „Vorderer Bereich“ wurde mit ^{32}P radioaktiv markiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit isoliertem Zellkernextrakt aus HT1080-Zellen, die zuvor mit hESR1-pSG5 transfiziert wurden. Zusätzlich wurden die Zellen mit Dextrin als Kontrolle, 10⁻⁸M E2 und 10⁻⁵M ICI in Kombination mit E2 behandelt. Die Auftrennung erfolgte in einem neutralen Polyacrylamidgel. Für die Kompetition wurde ein 150-facher molarer Überschuss an unmarkiertem Oligo dazugegeben. Für die Negativkontrolle wurde lediglich das ^{32}P -markierte Oligo aufgetragen. Die spezifischen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine spezifische Wechselwirkung des isolierten Zellkernextrakts aus HT1080-Zellen mit dem Bereich des hMMP2-Promotors von -315bp bis -266bp besteht. Interessanter Weise wurde durch die Behandlung der HT1080-Zellen mit E2 eine verstärkte Intensität einer der Banden im EMSA detektiert, deren Signal auf den Bereich der hMMP2-Sequenz zwischen -324bp und -287bp eingegrenzt werden konnte. Durch die gemein-

same Inkubation der Zellen mit ICI und E2 wurde das verstärkte Bandensignal aufgehoben. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich dabei möglicherweise um einen spezifischen DNA-Protein-Komplex handelt, der in Abhängigkeit des E2 aktivierten ER α gebildet wird oder verstärkt am Promotor bindet.

E2 aktiviert ER α durch die Bindung an den Rezeptor, der daraufhin an die Promotorsequenz bestimmter Zielgene rekrutiert wird. ER α bindet direkt oder indirekt über bereits am Promotor gebundene TF an die DNA-Sequenz.¹⁰⁸ Einer dieser TF ist Sp1. Die Komplexbildung von ER α und Sp1 führt im EMSA zu keiner Verschiebung der zu beobachtenden Bande, sondern durch eine gesteigerte Bindung von Sp1 an die DNA zu einem verstärkten Bandensignal.¹²² Es erscheint demnach möglich, dass es sich bei der beobachteten Verstärkung des Signals im vorangegangenen EMSA (Abb. 17) um eine verstärkte Bindung des TF Sp1 an einer vorhandenen putativen Bindungsstelle im hMMP2-Promotor handelte. Die Verifizierung erfolgte zunächst mit Hilfe eines spezifischen Sp1-AK. Hierfür wurde das ³²P-markierte Oligo „Vorderer Bereich“ gemeinsam mit Zellkernextrakt aus E2-behandelten HT1080-Zellen und dem spezifischen Sp1-AK inkubiert. Der Nachweis einer möglichen Interaktion von ER α mit Sp1 am hMMP2-Promotor wurde durch die Zugabe des spezifischen ER α -AK F-10 sowie eine Kombination aus beiden spezifischen AK Sp1 und F-10 AK zum radioaktiv markierten Oligo und dem Zellkernextrakt erbracht.

In Übereinstimmung mit dem vorangegangenen EMSA-Experiment waren die Banden I, II und III in der ersten Spur zu sehen (Abb. 18). Die Verdrängung der drei Banden durch das unmarkierte Oligo wies deren Spezifität nach (Spur 2). Die zusätzliche Inkubation mit dem spezifischen Sp1-AK erbrachte keine Veränderung des Bandenmusters gegenüber dem Ansatz ohne AK (Spur 3). Es konnten drei Banden detektiert werden, deren Spezifität durch die Zugabe von unmarkierten Oligo gezeigt wurde (Spur 4). Das Bandenmuster ließ nach der die Zugabe von F-10 AK (Spur 5) oder der Kombination aus F-10 und Sp1 AK (Spur 7) keine Änderung erkennen. Zu erkennen waren jeweils drei spezifische Banden, die durch den Überschuss an unmarkiertem Oligo verdrängt wurden (Spur 6 und 8). Die Negativkontrolle zeigte kein Signal auf der Höhe der spezifischen Banden (Spur 9). Eine ansteigende Menge an spezifischen Sp1-AK (2, 4 und 6 μ g) sowie die Inkubation des Zellkernextrakts mit dem MC-20 AK, einem anderen spezifischen AK gegen ER α , zeigte ebenfalls keine Veränderung im detektierten Bandenmuster (Daten nicht dargestellt).

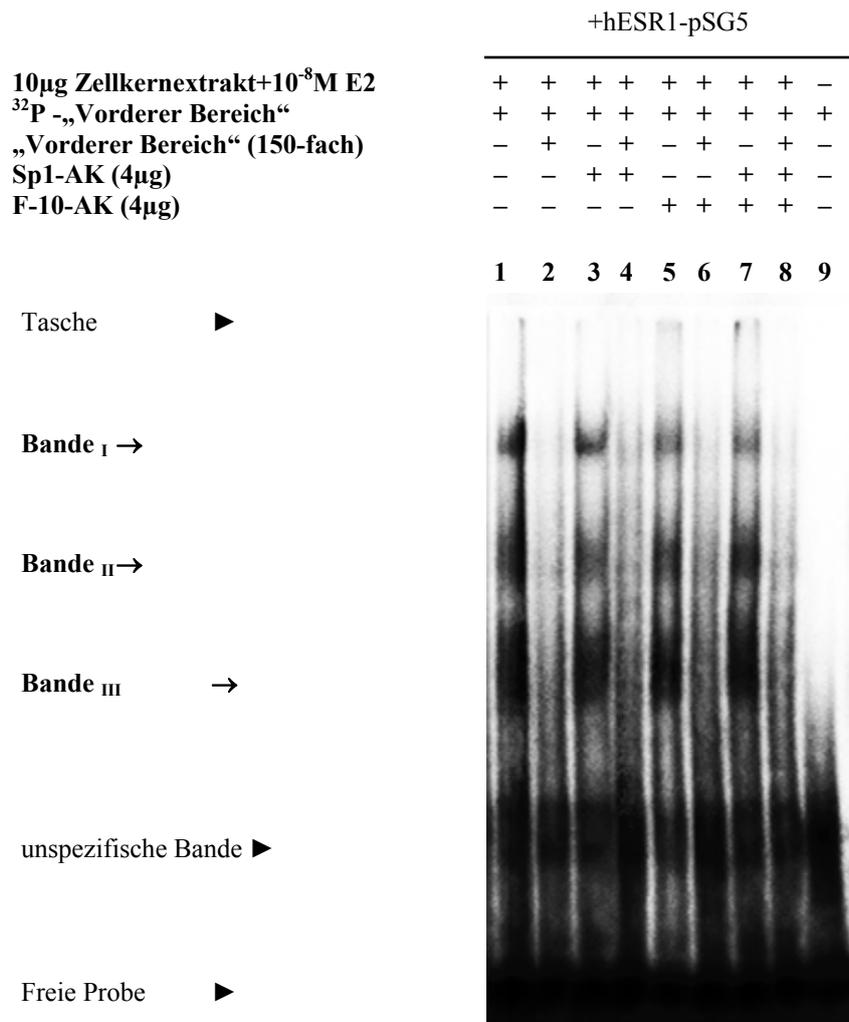


Abbildung 18: Untersuchungen zur Bindung von Sp1 und ER α am hMMP2-Promotor im Bereich von -324bp bis -287bp (relativ zum Translationsstart+1bp). Das Oligo „Vorderer Bereich“ wurde ³²P-radioaktiv markiert und mit 10µg Zellkernextrakt aus transfizierten und mit E2 behandelten HT1080-Zellen inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem neutralen Polyacrylamidgel. Für die Kompetition wurde ein 150-facher molarer Überschuss an unmarkiertem Oligo dazu gegeben. Zum Nachweis der Bindung von Sp1 wurde 4µg des spezifischen AK, sowie für ER α 4µg F-10 AK, dazugegeben. Zusätzlich erfolgte die Inkubation des Zellkernextrakts mit einer Kombination aus jeweils 4µg Sp1 und F-10 AK. Für die Negativkontrolle wurde ausschließlich ³²P-markiertes Oligo aufgetragen. Die spezifischen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Es lässt sich feststellen, dass mit Hilfe der eingesetzten spezifischen AK gegen Sp1 und ER α keine eindeutige Bindung von Sp1 und ER α am hMMP2-Promotor nachgewiesen werden konnte.

3.4.2.2 Analyse der putativen Elk-1 Bindungsstelle

Um die putative Bindungsstelle für den TF Elk-1 in der eingegrenzten hMMP2-Promotorsequenz näher zu untersuchen, wurde das Oligo „Elk-1“ in den EMSA eingesetzt. Dafür wurde ³²P-radioaktiv markiertes Oligo gemeinsam mit Zellkernextrakt aus Dextrin und

E2-behandelten HT1080-Zellen inkubiert. Die Bindung des TF Elk-1 wurde durch die Inkubation mit spezifischem AK gegen Elk-1 nachgewiesen (Abb. 19). Aus der Inkubation des ^{32}P -markierten Oligo „Elk-1“ mit dem Zellkernextrakt aus Dextrin behandelten HT1080-Zellen resultierte eine Bande (Spur 1, gekennzeichnet mit Pfeil), deren Spezifität durch die Verdrängung mit unmarkiertem Oligo bestätigt wurde (Spur 2). Durch die Zugabe des spezifischen Elk-1 AK konnte ein verstärktes Bandensignal sowie eine zusätzliche Bande detektiert werden (Spur 3, gekennzeichnet mit rotem Pfeil). Dabei handelt es sich um einen Shift des DNA-Protein Komplexes, an dem der TF Elk-1 beteiligt ist. Die Konkurrenz mit unmarkiertem Oligo verdrängte die detektierten Banden (Spur 4).

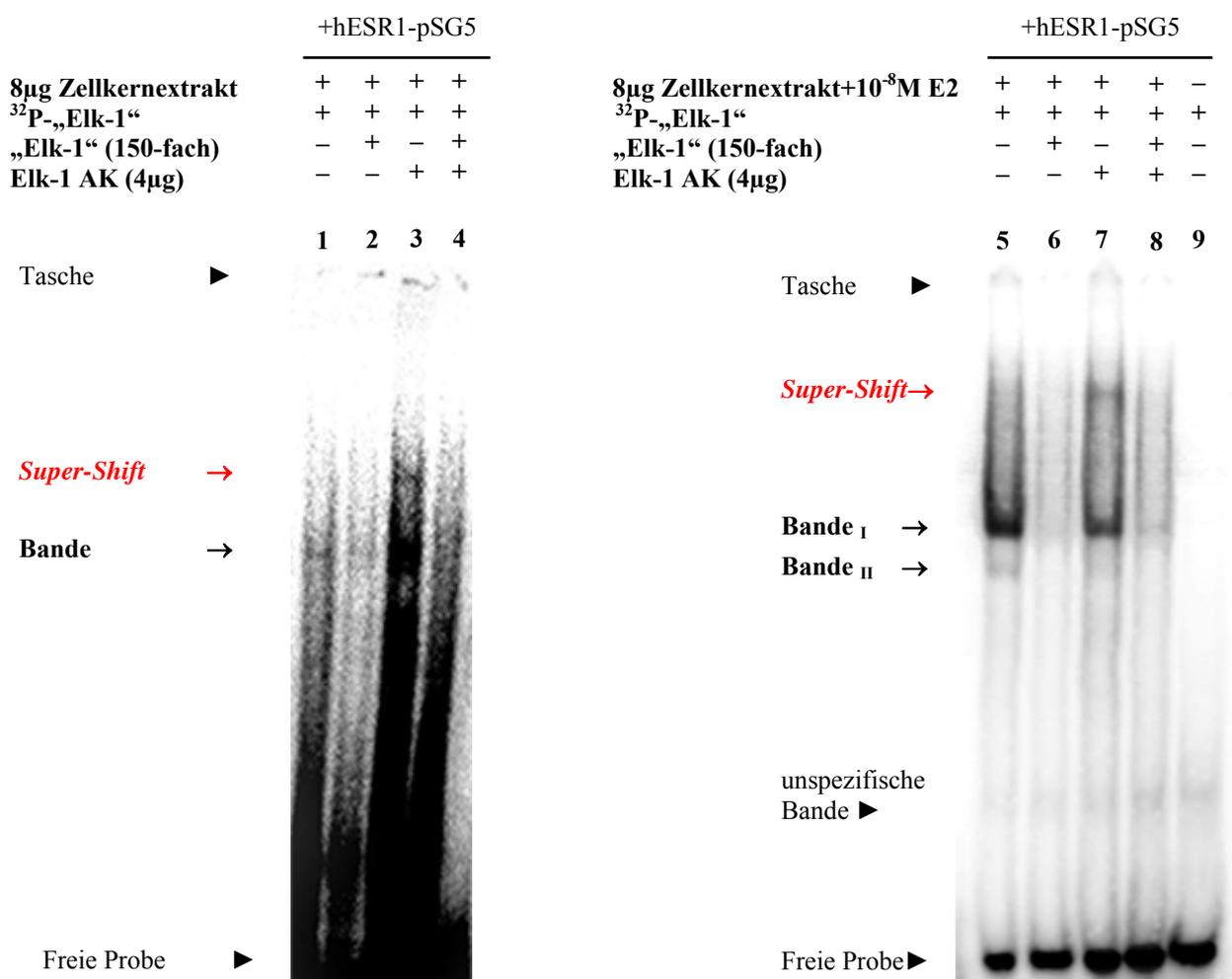


Abbildung 19: Untersuchung zur Bindung des TF Elk-1 an der putativen Elk-1 Bindungsstelle. Das Oligo „Elk-1“ (Spur 1-9), mit der putativen Bindungsstelle für Elk-1, wurde mit ^{32}P -radioaktiv markiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Oligo mit 8µg transfiziertem Zellkernextrakt aus HT1080-Zellen, die mit Dextrin als Kontrolle (Spur 1-4) und E2 (Spur 5-9) behandelt wurden. Die Auftrennung erfolgte in einem neutralen Polyacrylamidgel. Für die Konkurrenz wurde ein 150-facher molares Überschuss an unmarkiertem Oligo dazu gegeben. Zum Nachweis der Bindung von Elk-1 am hMMP2 Promotor wurde der Ansatz mit 4µg spezifischem Elk-1 AK inkubiert (Spur 3 und 7). Für die Negativkontrolle wurde ausschließlich radioaktiv markiertes Oligo aufgetragen (Spur 9). Die spezifischen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der *Super-Shift* ist mit einem roten Pfeil markiert

Die Inkubation des radioaktiv markierten „Elk-1“ Oligo mit Zellkernextrakt aus E2 behandelten HT1080-Zellen ließ zwei Banden erkennen (Bande I und II in Spur 5), deren Spezifität durch die Verdrängung mit unmarkiertem Oligo nachweisbar war (Spur 6). Die Zugabe von spezifischem Elk-1 AK zeigte eine zusätzliche Bande (Spur 7 mit einem roten Pfeil gekennzeichnet), wodurch nachgewiesen wurde, dass Elk-1 an dem gebildeten Protein-DNA Komplex beteiligt ist. Zusätzlich war auf Grund der besseren Aufnahme des Bandenmusters eine Abschwächung der Signalstärke beider Banden zu erkennen, wobei das Signal der unteren Bande fast völlig verschwand. Dieser Befund ergab einen weiteren Hinweis darauf, dass der am Oligo gebundene Proteinkomplex durch den Elk-1 AK geshiftet wurde. Alle drei Banden konnten durch die Zugabe von unmarkiertem Oligo fast vollständig verdrängt werden (Spur 8). Der Auftrag des radioaktiv markierten „Elk-1“ Oligo allein zeigte nur ein Signal auf der Höhe der freien Probe (Spur 9).

Die Inkubation des radioaktiv markierten „Elk-1“ Oligo mit dem Zellkernextrakt aus Dextrin und E2 behandelten HT1080-Zellen zeigte, dass innerhalb der hMMP2-Promotorsequenz zwischen -296bp und -256bp ebenfalls eine spezifische Bindung der Kernproteine vorliegt. Zusätzlich konnte unter Zuhilfenahme des spezifischen Elk-1 AK die Bindung des TF Elk-1 innerhalb der eingrenzten hMMP2 Promotorregion nachgewiesen werden. Dabei konnte ein *Super-Shift* mit dem Zellkernextrakt aus Dextrin und E2 behandelten Zellen detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass die Bindung des TF an der Promotorsequenz unabhängig von der E2-Behandlung vorzuliegen scheint.

3.4.2.3 Analyse zur Bindung des phosphorylierten Transkriptionsfaktors Elk-1

Duan *et al.*, Hennessy *et al.* und Chen *et al.* wiesen die Phosphorylierung des TF Elk-1 durch E2 nach.¹²³⁻¹²⁵ Aus diesem Grund wurden weitere *Super-Shift*-Analysen durchgeführt. Diese sollten den Nachweis darüber erbringen, ob nach der Behandlung der HT1080-Zellen mit E2 auch eine Bindung der phosphorylierten Form von Elk-1 (p-Elk-1) am hMMP2-Promotor vorliegt. Hierfür wurde nicht der Elk-1 AK aus den vorangegangenen EMSA-Analysen, der die phosphorylierte und nicht phosphorylierte Form des TF erkennt, eingesetzt. Es wurde ein monoklonaler AK verwendet, der ausschließlich am phosphorylierten Serin 383 des Elk-1 bindet (Abb. 20).

Die Inkubation des radioaktiv markierten „Elk-1“ Oligo mit Zellkernextrakt aus E2-behandelten HT1080-Zellen zeigte zwei Banden (Spur 1, Bande I und II). Unmarkiertes Oligo verdrängte beide Banden – was den Nachweis für die Spezifität erbrachte (Spur 2). Bei der Inkubation des ³²P-markierten Oligo und des isolierten Zellkernextraktes mit dem AK gegen p-Elk-1, konnte kei-

ne Veränderung gegenüber dem Ansatz ohne AK in Spur 1 beobachtet werden (Spur 3). Die Erhöhung der Menge an p-Elk-1 AK führte zu einer proportionalen Abnahme der Signalintensität beider spezifischer Banden (Spur 4 und 5).

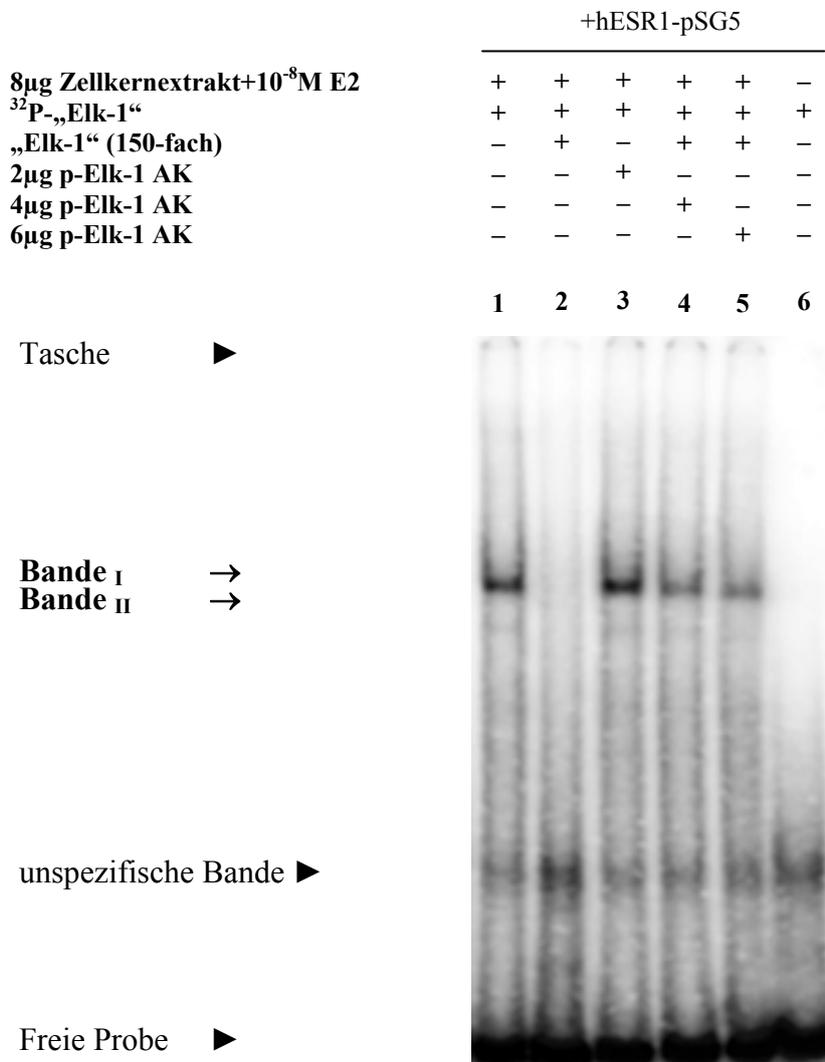


Abbildung 20: Analyse der Bindung des phosphorylierten Elk-1 Proteins an der putativen Elk-1 Bindungsstelle. Das Oligo „Elk-1“ wurde mit ³²P-radioaktiv markiert und mit 8µg transfiziertem Zellkernextrakt, das mit E2 behandelt wurde, inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem neutralen Polyacrylamidgel. Für die Kompetition wurde ein 150-facher molarer Überschuss an unmarkiertem Oligo dazu gegeben. Zum Nachweis der Bindung von p-Elk-1 am hMMP2-Promotor wurden 2µg, 4µg und 6µg spezifischer AK gegen p-Elk-1 mit eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ausschließlich das ³²P-markierte Oligo aufgetragen. Die spezifischen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Eine zusätzliche Bande, welche die Shiftung des DNA-Protein-Komplexes anzeigt, konnte nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass nur ein Teil des am hMMP2-Promotor gebundenen Elk-1 in phosphorylierter Form vorlag, so dass der AK nur eine kleine, als *Super-Shift* Signal nicht mehr detektierbare, Menge binden konnte. Die Negativkon-

trolle, die ausschließlich das ^{32}P -markierte Elk-1 Oligo enthielt, zeigte kein Signal auf der Höhe der spezifischen Banden (Spur 6).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Zugabe einer ansteigenden Konzentration an p-Elk-1 kein eindeutiger *Super-Shift* detektiert werden konnte. Interessanter Weise konnte mit zunehmender AK-Konzentration eine proportional verlaufende Abnahme der Bandenintensität beider spezifischer Signale gezeigt werden, ähnlich der Beobachtung bei dem *Super-Shift* von Elk-1 in Abb. 19. Dieses Ergebnis liefert somit einen Hinweis auf eine mögliche Bindung des p-Elk-1 an der Bindungsstelle für Elk-1 innerhalb des hMMP2-Promotors nach E2-Behandlung.

3.5 Analyse des 17 β -Estradiol Signaltransduktionsweges zur Inhibition der humanen MMP2-Promotor Aktivität

Zur Analyse, ob der TF Elk-1 durch E2 in HT1080-Zellen phosphoryliert wird, wurden die Zellen mit dem hESR1-pSG5 Konstrukt transfiziert und im Anschluss mit E2 sowie Dextrin als Kontrolle behandelt. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit ICI sollte nachweisen, ob die E2-vermittelte Phosphorylierung von Elk-1 über die ER vermittelt wird. Yamazaki *et al.* wiesen nach, dass die Phosphorylierung des TF Elk-1 über die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges durch E2 vermittelt wird.¹²⁶ Der spezifische Inhibitor PD98059 diente dazu, die Aktivierung der MAPK-ERK1/2 Signalkaskade zu unterbinden und sollte helfen aufzuklären, ob E2 seine Wirkung über diesen Signaltransduktionsweg vermittelt.

Nach der Behandlung der HT1080-Zellen mit Dextrin, E2, ICI und PD98059 wurde das Gesamtprotein isoliert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und p-Elk-1 mit dem spezifischen AK detektiert. GAPDH wurde zur Normierung der ermittelten Werte für p-Elk-1 bei der densitometrischen Auswertung herangezogen. Innerhalb der einzelnen Versuche wurde der Ansatz der Kontrolle als Basis und dessen errechneter Wert gleich Eins gesetzt. Alle anderen Werte wurden darauf bezogen.

3.5.1 Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor Elk-1 in HT1080-Zellen

Nach der Behandlung der HT1080-Zellen mit E2 stieg der Phosphorylierungsstatus von Elk-1 signifikant auf ein 2,34-faches gegenüber der Kontrolle an (Abb. 21 B). In den zuvor mit ICI und anschließend mit E2 behandelten Zellen wurde die Phosphorylierung von Elk-1 signifikant blo-

kiert. Die ausschließlich mit ICI inkubierte Zellen zeigten eine dem Kontrollansatz vergleichbare Elk-1 Phosphorylierung (0,87-fach).

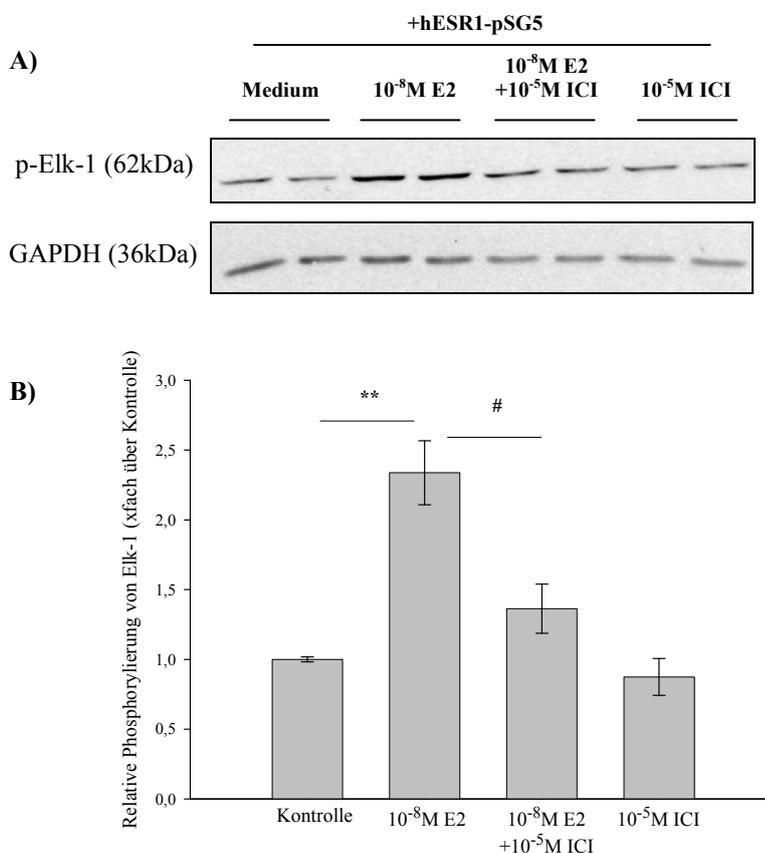


Abbildung 21A-B: Einfluss von E2 auf die Phosphorylierung von Elk-1 in HT1080-Zellen. Die Abb. 21A zeigt exemplarisch die Phosphorylierung von Elk-1 und Expression von GAPDH im Doppelansatz. Abb. 21B zeigt die graphische Auswertung der densitometrischen Messung von p-Elk-1 normiert auf GAPDH. Die Zellen wurden für 24h mit 500ng hESR1-pSG5 transfiziert und anschließend für 24h mit Dextrin als Kontrolle, 10^{-8} M E2, E2 und 10^{-5} M ICI und ausschließlich ICI behandelt. Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n=3), jeweils im Doppelansatz durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Kontrollansatz jedes einzelnen Versuches wurde gleich Eins gesetzt, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. ** $p \leq 0,01$ gegenüber dem Kontroll-Ansatz und # $p \leq 0,05$ bezogen auf den Ansatz mit E2.

Die durchgeführten Analysen bestätigen die E2-vermittelte Phosphorylierung von Elk-1 in den HT1080-Zellen. Die Blockierung der ER durch den E2-Antagonisten ICI gibt einen Hinweis darauf, dass E2 seinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Elk-1 über die Rezeptoren vermittelt.

3.5.2 Phosphorylierung von Elk-1 über den MAP-Kinase Signalweg

In Übereinstimmung mit dem vorangegangenen Versuch (Kapitel 3.5.1) stieg der Phosphorylierungsstatus von Elk-1 durch die Behandlung der Zellen mit E2 signifikant (2,34-fach) gegenüber der Kontrolle an (Abb. 22).

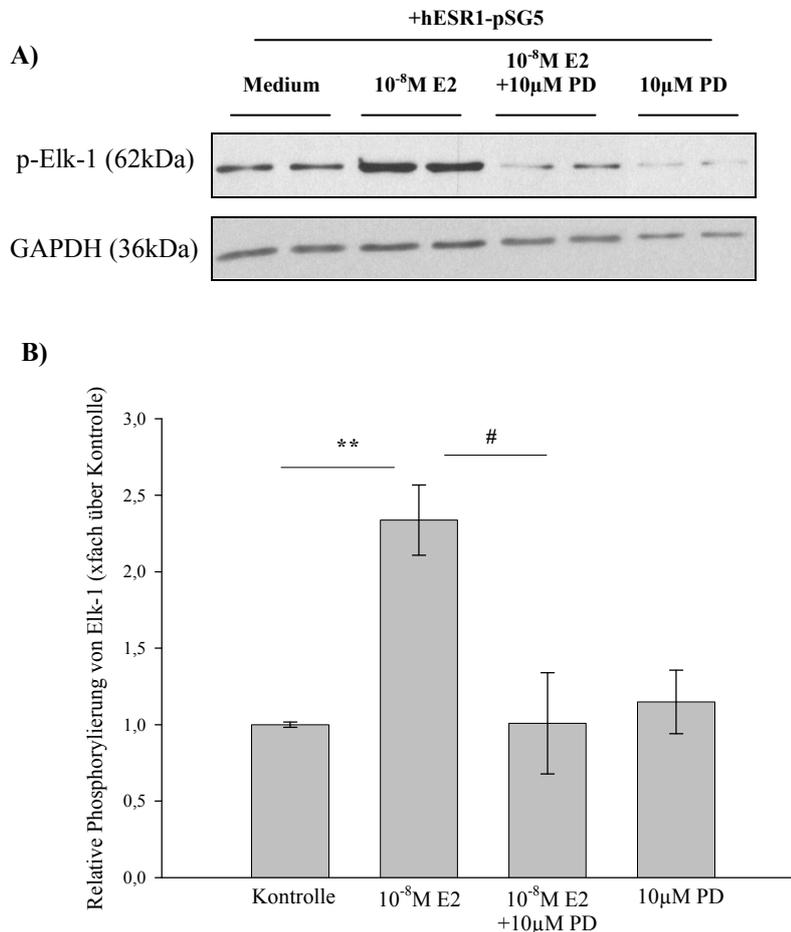


Abbildung 22 A-B: Einfluss des MAPK-ERK1/2 Signalweges auf die E2-induzierte Phosphorylierung von Elk-1 in HT1080-Zellen. Die Abb. 22A zeigt exemplarisch die Phosphorylierung von Elk-1 und Expression von GAPDH im Doppelansatz. Abb. 22B zeigt die graphische Auswertung der densitometrischen Messung von p-Elk-1 normiert auf GAPDH. Die Zellen wurden für 24h mit 500ng hESR1-pSG5 Konstrukt transfiziert und anschließend für 24h mit Dextrin als Kontrolle, 10⁻⁸M E2, E2 und 10^μM PD98059 (PD) und PD98059 (PD) behandelt. Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n=3). Der ermittelte Wert für den Ansatz der Kontrolle jedes einzelnen Versuches wurde gleich Eins gesetzt, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. **p≤0,01 bezogen auf den Kontrollansatz mit und #p≤0,05 bezogen auf den Ansatz mit E2.

Die Inkubation der transfizierten HT1080-Zellen mit PD98059 inhibierte die E2-vermittelte Phosphorylierung von Elk-1 signifikant. Die ausschließliche Behandlung der Zellen mit dem MAPK-ERK1/2-Inhibitor zeigte gegenüber dem Kontrollansatz einen vergleichbaren Phosphorylierungsstatus von Elk-1 (1,15-fach). Diese Ergebnisse stellen ein Indiz dafür, dass E2 die

Phosphorylierung von Elk-1 über die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges in den HT1080-Zellen vermittelt.

3.5.3 Einfluss des MAP-Kinase Signalweges auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2-Promotors

Des Weiteren sollte analysiert werden, ob E2 seine inhibierende Wirkung auf die hMMP2-Promotor Aktivität ebenfalls über den MAPK-ERK1/2 Signaltransduktionsweg vermittelt. Dafür wurden die mit dem hMMP2-417-pGL2- und hESR1-pSG5-Konstrukt kotransfizierten HT1080-Zellen einer Inkubation mit PD98059 und anschließend einer 24h Behandlung mit E2 unterzogen. Die Luc-Aktivitätsmessungen zeigten nach der E2-Behandlung eine signifikante Reduktion der Luc-Aktivität auf ein 0,70-faches im Vergleich zum Kontrollansatz (Abb. 23). Wurden die Zellen mit dem Inhibitor des MAPK-ERK1/2-Signalweges, PD98059, behandelt, konnte die reduzierende Wirkung von E2 signifikant gehemmt werden und die Luc-Aktivität kehrte auf das Niveau des Kontrollansatzes zurück. Diese Befunde weisen darauf hin, dass E2 seine hemmende Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität des hMMP2-Promotors über die Aktivierung des MAPK-ERK1/2-Signalweges vermittelt.

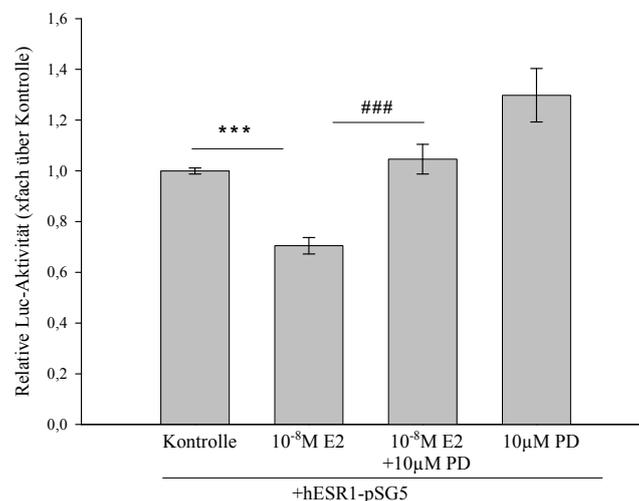


Abbildung 23: Relative Luc-Aktivität des hMMP2-417-pGL2 Konstrukt nach E2- und PD98059 Behandlung. Das hMMP2-417-pGL2 Konstrukt wurde gemeinsam mit 500ng des hESR1-pSG5 Konstrukt für 24h in HT1080-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24h mit Dextrin als Kontrolle, 10⁻⁸M E2, E2 und 10μM PD98059 (PD) und ausschließlich PD behandelt. Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n≥3), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Kontrollansatz jedes einzelnen Versuches wurde gleich Eins gesetzt, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. *p≤0,001 gegenüber dem Ansatz der Kontrolle, #p≤0,001 bezogen auf den Ansatz mit E2.

3.6 Analyse der endogenen mRNA-Expression des humanen MMP2-Gens in HT1080-Zellen

Es wurde abschließend untersucht, ob E2 die endogene mRNA-Expression des humanen MMP2-Gens in HT1080-Zellen reduziert. Die Zellen wurden mit dem hESR1-pSG5-Konstrukt transfiziert und anschließend mit E2 behandelt. Zur Untersuchung der Regulationsmechanismen, über die E2 wirken kann, wurden die Zellen zusätzlich mit dem E2-Antagonisten ICI und dem spezifischen MAPK-ERK1/2 Signalweg Inhibitor PD98059 jeweils in Kombination mit E2 behandelt. Als Kontrolle dienten transfizierte HT1080-Zellen, die ausschließlich mit ICI oder PD98059 behandelt wurden. Nach Behandlung der Zellen mit den Agenzien wurde die GesamtrNA isoliert und die mRNA-Expression des hMMP2-Gens quantifiziert. Zur Normalisierung diente die gemessene mRNA-Expression von GAPDH. Innerhalb der einzelnen Versuche wurde der Ansatz der Kontrolle als Basis und dessen errechneter Wert gleich Eins gesetzt. Alle anderen Werte wurden darauf bezogen. (Abb. 24).

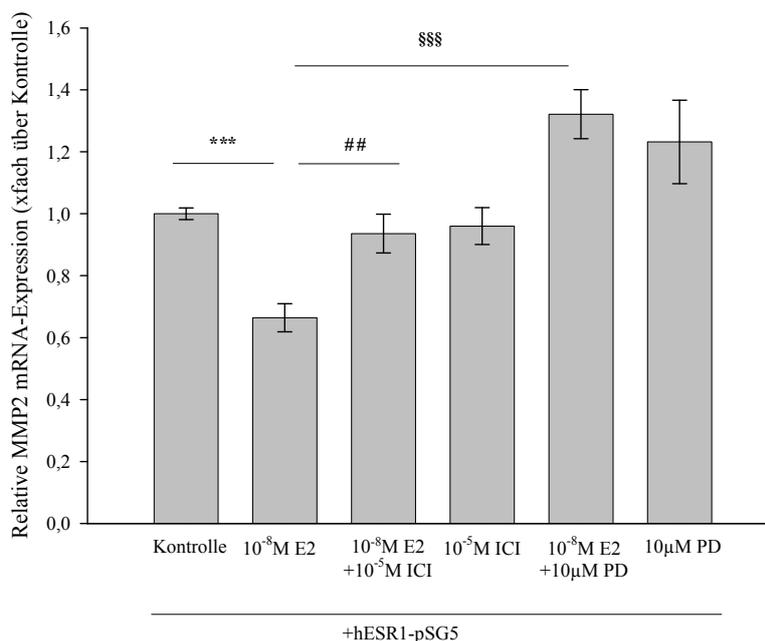


Abbildung 24: Relative mRNA-Expression des endogenen hMMP2 Gens in HT1080-Zellen nach der Behandlung mit Dextrin, E2, ICI 182,780 und PD98059. Dargestellt ist die relative endogene hMMP2 mRNA-Expression in HT1080-Zellen nach 24h TF mit hESR1-pSG5 und 24h Behandlung der Zellen mit Dextrin als Kontrolle, 10⁻⁸M E2, E2 und 10⁻⁵M ICI in Kombination, ausschließlich ICI, 10 μM PD98059 (PD) mit E2 und 10 μM PD allein. Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n≥3), jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der ermittelte Wert für den Ansatz der Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. ***p≤0,001 bezogen auf den Kontrollansatz, ##p≤0,01 bezogen auf den Ansatz mit E2 und \$\$\$p≤0,001 bezogen auf den Vergleich zwischen E2 und E2 in Kombination mit PD98059.

In Übereinstimmung mit der durch E2 reduzierten hMMP2-Promotor-Aktivität in den vorangegangenen Experimenten (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) reduzierte E2 die mRNA-Expression von MMP2 signifikant auf ein 0,66-faches gegenüber der Kontrolle. Durch die Vorinkubation der Zellen mit ICI wurde der reduzierende Einfluss von E2 signifikant revidiert und die hMMP2 mRNA-Expression erreichte ungefähr das Expressionsniveau des Kontrollansatzes. Die Behandlung der HT1080-Zellen mit PD98059 in Kombination mit E2 hob den reduzierenden Effekt von E2 ebenfalls signifikant auf. Die ausschließliche Inkubation der Zellen mit ICI oder PD98059 führte zu keiner signifikanten Veränderung der hMMP2 mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eine inhibitorische Wirkung von E2 auf die endogene mRNA-Expression des hMMP2-Gens. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass E2 seine Wirkung auf die hMMP2 mRNA-Expression über die ER sowie durch die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges vermittelt. Außerdem zeigten parallel durchgeführte Versuche mit HT1080-Zellen, die nicht mit dem hESR1-pSG5 Konstrukt transfiziert wurden, ebenfalls eine Reduktion der endogenen hMMP2 mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse untermauern die beobachtete Regulation des hMMP2-Promotors durch E2 und weisen darauf hin, dass der Regulationsmechanismus auf die endogene mRNA-Expression des hMMP2 Gens übertragbar ist.

4 Diskussion

Zum besseren Verständnis der beobachtenden geschlechterabhängigen Unterschiede bei den Umbauprozessen innerhalb der EZM während des pathologischen Remodelings, ist es von entscheidender Bedeutung zu klären, welche der Matrixkomponenten durch E2 reguliert werden. Außerdem ist es wichtig zu klären, über welchen Mechanismus das Steroidhormon seine Wirkung auf die mRNA-Expression der extrazellulären Gene im Myokard ausübt. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixgene Kollagen I und III sowie MMP2 und MMP9 in kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten analysiert. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass E2 einen Einfluss auf die mRNA-Expression von Kollagen I und III in kardialen Fibroblasten hat, die geschlechterabhängig reguliert wird. In den Fibroblasten der weiblichen Ratten kam es dabei zu einer reduzierten mRNA-Expression von Kollagen I und III, wohingegen in den Zellen der männlichen Ratten eine erhöhte mRNA-Expression beider Kollagentypen nach E2-Behandlung beobachtet werden konnte. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von MMP2 und MMP9 in den Fibroblasten beider Geschlechter durch die Behandlung mit E2 vermindert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass E2 in den kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten eine stimulierende Wirkung auf die mRNA-Expression von ER α und ER β hat.

Funktionelle Analysen des hMMP2-Promotors zeigten einen reduzierenden Einfluss von E2, in Abhängigkeit von ER α , auf dessen transkriptionelle Aktivität in humanen Fibroblasten. Dabei konnte der regulatorische Bereich auf die Region zwischen -324bp und -260bp (relativ zum Translationsstart +1bp) innerhalb der hMMP2-Promotorsequenz näher eingegrenzt werden. Mit Hilfe weiterführender Untersuchungen konnte die Bindung des TF Elk-1 am hMMP2-Promotor nachgewiesen werden sowie ein Hinweis auf eine mögliche Bindung der phosphorylierten Form von Elk-1 nach E2-Behandlung erbracht werden. Abschließend konnte gezeigt werden, dass E2 über die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges den TF Elk-1 phosphoryliert und seine reduzierende Wirkung auf die Promotor-Aktivität des hMMP2-Gens über diesen Signaltransduktionsweg vermittelt.

4.1 Verifizierung der isolierten Fibroblasten aus adultem Rattenmyokard

Als Voraussetzung für die Untersuchung zum Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixgene in den kardialen Fibroblasten mussten die isolierten Zellen frei von

Verunreinigungen mit anderen kardialen Zellen vorliegen. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe des Kollagenase-Dispase-Verdau isoliert, der die Gewinnung einer Fibroblasten-Primärkultur mit hohem Reinheitsgrad ermöglicht.^{114, 118, 127} Die isolierten Zellen lagen in einer Einzelschicht vor und wiesen die für Fibroblasten charakteristischen Morphologiemerkmale, wie einen großen ovalen Nukleus und eine spindelförmige mit zunehmender Konfluenz sternenförmige Gestalt, auf.^{117, 118} Die positive Anfärbung der isolierten Zellen mit dem spezifischen Fibroblastenmarker Vimentin zeigte,¹⁶ dass es sich bei den isolierten Zellen um kardiale Fibroblasten handelte. Eine Gegenfärbung der Zellen mit dem Anti-Von Willebrand Faktor VIII, als spezifischer Endothelzellen-Marker,¹¹⁸ zeigte in den isolierten Zellen kein Signal. Die durchgeführten morphologischen und immunhistochemischen Untersuchungen ergaben einen Hinweis auf eine frei von Verunreinigungen vorliegende Isolation kardialer Fibroblasten.

4.2 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die intrazelluläre Lokalisation und mRNA-Expression von ER α und ER β in kardialen Rattenfibroblasten

Die mRNA-Expression von ER α und ER β konnte in den isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten weiblichen und männlichen Ratten mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 2). Die immunhistochemische Anfärbung der Zellen mit spezifischen AK gegen ER α und ER β bestätigte die Expression auf Proteinebene (Abb. 3 und 4) und ermöglichte die Lokalisierung der ER im Zytoplasma und Nukleus un behandelter kardialer Fibroblasten (Abb. 3A und 4A). Nach der Behandlung mit E2 kam es zu einer Verlagerung beider ER vom Zytoplasma in den Nukleus (Abb. 3E und 4E). Diese Beobachtung liefert einen Hinweis darauf, dass die im Zytoplasma vorhandenen Rezeptoren durch die Bindung von E2 aktiviert werden,¹²⁸ um im Nukleus als ligandengebundene TF die Expression ihrer Zielgene zu regulieren. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die bereits in Rattenfibroblasten gezeigte mRNA- und Proteinexpression beider ER sowie deren Aktivierung durch E2.¹²⁸⁻¹³¹ Da E2 seine Wirkung hauptsächlich über die Rezeptoren ER α und ER β ausübt,¹⁰⁸ wurde davon ausgegangen, dass die Voraussetzungen für eine erfolgreiche E2-Behandlung der adulten kardialen Fibroblasten gegeben war.

Die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit E2 führte zu einer erhöhten mRNA-Expression von ER α und ER β in den Zellen aus weiblichen und männlichen Ratten (Abb. 5-8). Der stimulierende E2-Effekt konnte durch den E2-Antagonisten ICI aufgehoben werden. Dieses Ergebnis liefert einen direkten Hinweis darauf, dass die ER an der Regulation ihrer eigenen Transkription beteiligt sind. Hierbei wird vermutet, dass es sich um eine positive Autoregulation der

mRNA-Expression beider ER in den kardialen Fibroblasten nach E2-Behandlung handelt. Read *et al.* und andere Autoren zeigten in verschiedenen Zelltypen ebenfalls eine positive Autoregulation der mRNA-Expression beider ER nach E2-Behandlung.^{89, 132, 133} Der molekulare Mechanismus dieser Autoregulation ist bislang nur unvollständig bekannt.¹⁰⁸ Einige Analysen wiesen eine Autoregulation der Promotoraktivität von ER α in Abhängigkeit des Rezeptors und unabhängig von E2 nach.¹³⁴⁻¹³⁷ Erst kürzlich demonstrierten Lambertini *et al.*, dass der stimulierende Effekt von E2 auf die Promotoraktivität des ER α -Gens unter anderem durch die direkte Bindung von ER α an den Promotor realisiert wird.¹³⁸

Die zum Teil geringere mRNA-Expression von ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten nach der Behandlung mit ICI (Abb. 5-8) könnte durch diesen Autoregulationsmechanismus erklärt werden. Der E2-Antagonist ICI entfaltet seine Wirkung indem er an ER α und ER β bindet und damit die Bindung von E2 als Ligand verhindert. Die ER können nicht mehr dimerisieren und in den Nukleus translozieren. Zusätzlich kommt es durch die Bindung von ICI an die ER zu einer erhöhten Degradation beider Rezeptoren.^{139, 140} Somit ist vorstellbar, dass die erhöhte Abbaurate beider ER der Grund für die Einschränkung der positiven Autoregulation in den kardialen Fibroblasten ist. Durch die Behandlung der Zellen mit ICI stehen weniger ER zur Verfügung, die als TF die positiven Autoregulation von ER α und ER β beeinflussen können, was zu einer Reduktion der mRNA-Expression von ER α und ER β führt.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die mRNA-Expression von ER α und ER β in Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit E2 unterschiedlich reguliert wurde. Eine unterschiedliche Sensitivität der ER gegenüber E2, die möglicherweise auf Differenzen im Expressionsniveau von ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten zurückzuführen ist, könnte dafür verantwortlich sein. Webb *et al.* wiesen nach, dass die Wirkung von Steroidhormonen zum großen Teil über die Menge der Rezeptoren reguliert wird, wobei die Anzahl der vorhandenen zellulären ER entscheidend für die E2-Antwort ist.¹⁴¹ Denkbar wäre, dass unterschiedliche Mengen an ER α und ER β in den kardialen Fibroblasten der weiblichen und männlichen Ratten den limitierenden Faktor bei der positiven Autoregulation durch E2 darstellen. Untersuchungen, die ein unterschiedliches ER α und ER β Expressionsniveau jeweils zwischen weiblichen und männlichen Patienten und Ratten in isolierten Zellen und Gewebe zeigten, bestärken diese Hypothese.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Grohe *et al.* postulierten auf Grund einer höheren transkriptionellen Aktivierung eines ERE-Reporter-Plasmides eine höhere Proteinexpression beider ER in den kardialen Fibroblasten weiblicher Ratten gegenüber den männlichen Tieren.¹²⁸ Immunhistochemische Untersuchungen an

kardialen Fibroblasten weiblicher Ratten von Lee *et al.* zeigten eine, im Vergleich zu ER α , dominierende ER β -Expression.¹³¹ Quantitative Analysen zum Expressionsniveau der ER wurden in beiden Arbeiten jedoch nicht beschrieben. Quantitative PCR- und semiquantitative WB-Analysen könnten einen Aufschluss darüber geben, ob sich die mRNA- und Proteinexpression von ER α und ER β in kardialen Fibroblasten weiblicher und männlicher Tiere unterscheidet und demzufolge verschieden durch E2 reguliert werden.

4.3 Geschlechterspezifische Regulation der mRNA-Expression von Kollagen I und III in kardialen Rattenfibroblasten durch 17 β -Estradiol

Die Behandlung der kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten mit E2 führte zu einer geschlechterabhängigen Regulation der mRNA-Expression von Kollagen I und III (Abb. 9 und 10). Die isolierten Fibroblasten aus dem Myokard weiblicher Ratten zeigten eine reduzierte mRNA-Expression von Kollagen I und III nach E2-Behandlung. In den Zellen der männlichen Tiere hingegen erhöhte sich die mRNA-Expression beider Kollagene durch die Inkubation mit E2. Obwohl eine Vielzahl an Untersuchungen die zelltypabhängige Stimulation oder Inhibierung von E2 auf die mRNA- und Proteinexpression sowie Biosynthese von Kollagen I und III nachwies,^{88-91, 94, 95, 115, 145, 146} existieren nur sehr wenige Arbeiten, die sich detaillierter mit der E2 vermittelten Regulation der mRNA-Expression von Kollagen I und III beschäftigten. Silbiger *et al.* sowie Neugarten *et al.* zeigten eine durch E2 hervorgerufene Reduktion der mRNA-Expression von Kollagen I in Mesangialzellen.^{94, 95} Die Autoren wiesen in den mit E2 behandelten Zellen eine erhöhte AP-1 Proteinexpression nach und beobachteten in EMSA-Analysen eine verstärkte Bindung des Zellkernextrakts an einem Oligo mit AP-1 Konsensussequenz. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine verstärkte Interaktion des TF AP-1 am Kollagen I-Promotor zur Reduktion der mRNA-Expression führt. Die im Kollagen I-Promotor für den regulatorischen Effekt von E2 verantwortliche putative Bindungsstelle für AP-1 wurde von den Autoren nicht identifiziert. Sie stützten sich auf Untersuchungen, die bereits zeigten, dass mehrere funktionelle AP-1 Bindungsstellen in beiden α_1 und α_2 Kollagen I-Promotoren existieren.^{147, 148} Weiterführende Arbeiten von Neugarten *et al.* zeigten die Inhibition der Kollagen I Synthese in Mesangialzellen durch Genistein,¹⁴⁵ einen mit höherer Affinität an den ER β bindenden E2-Agonisten.¹⁴⁹ Die von Ihnen beobachtete Reduktion konnte durch den E2-Antagonisten ICI aufgehoben werden, was vermuten lässt, dass ER β für die beschriebene Inhibierung verantwortlich ist.

Surazynski *et al.* zeigten einen Anstieg der Kollagenbiosynthese nach E2-Behandlung in isolierten humanen Hautfibroblasten.⁸⁹ Dabei postulierten die Autoren eine durch E2 vermittelte Wirkung auf die Kollagen I mRNA-Expression über den TF Sp1. Eine solche Regulation ist vorstellbar, da innerhalb der Kollagen I-Promotorsequenz mehrere Bindungsstellen Sp1 bereits nachgewiesen wurden.¹⁵⁰ Eine beschriebene Interaktion von Sp1 mit beiden ER¹⁵¹ unterstützt diese Annahme, wurde jedoch von den Autoren nicht näher untersucht. Im Gegensatz zu dem Promotor des Kollagen I-Gens ist über die Regulation des Kollagen III-Promotors (α_1) relativ wenig bekannt. Wie für Kollagen I,¹⁵² ist für den Kollagen III-Promotor noch kein putatives ERE Bindungsmotiv in der Literatur beschrieben. Nach derzeitigem Kenntnisstand wird die Expression von Kollagen III durch mehrere positive und negative TF reguliert,¹⁵³ wobei eine Bindung der TF Sp1 und AP-1 am Promotor des Kollagen III-Gens bislang noch nicht beschrieben wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der molekulare Mechanismus, über den E2 seine Wirkung auf die Expression von Kollagen I und III ausübt, noch nicht geklärt ist. Die genannten Studien liefern nur Ansätze für Mechanismen, über die E2 seinen Effekt auf die mRNA-Expression beider Kollagene in den kardialen Fibroblasten möglicherweise ausübt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Kollagen I und III durch E2 geschlechterabhängig verschieden reguliert wird. Es stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus E2 die gegensätzliche Regulation der mRNA-Expression vermittelt. Geschlechterabhängige Wirkungen von E2 in weiblichen und männlichen Tieren sowie in isolierten Zellen beider Geschlechter wurden bereits in anderen Arbeiten gezeigt.^{142, 144, 154-162} Die Regulationsmechanismen für E2 wurden dabei zwar nur teilweise aufgeklärt, geben jedoch Erklärungsansätze für die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die ER, die hauptsächlich für die Vermittlung der E2-Effekte zuständig sind,¹⁰⁸ unterschiedlich in den kardialen Fibroblasten der weiblichen und männlichen Ratten exprimiert und reguliert werden. Erstens kann ein unterschiedliches Expressionsniveau beider ER vorliegen. Hinweise darauf liefert eine Studie von Corthesy *et al.*, die ein unterschiedliches Expressionsniveau beider ER in der Hirnanhangsdrüse weiblicher und männlicher Ratten zeigt.¹⁴² Die zweite Möglichkeit ist die unterschiedliche Expression verkürzter Isoformen, die von Friend *et al.* in der Hirnanhangsdrüse weiblicher und männlicher Ratten nachgewiesen werden konnte.¹⁴³ Drittens kann eine differentielle Regulation und Aktivierung der ER durch E2 für die geschlechterabhängige Regulation verantwortlich sein. Eine unterschiedliche Aktivierung der ER zwischen beiden Geschlechtern konnte jeweils in isolierten humanen und Rattenzellen gezeigt werden.^{128, 144} Somit ist vorstellbar, dass eine unterschiedliche

ER-Expression und Aktivierung – ähnlich der gewebespezifischen Expressions-Regulation durch E2¹⁶³ – für die geschlechterabhängige Regulation der Kollagen I und III mRNA-Expression in den kardialen Fibroblasten verantwortlich ist.

Bekannt ist, dass ER α und ER β die Promotoraktivität bestimmter Zielgene nach E2-Behandlung gegensätzlich regulieren können.¹⁰⁸ Die unterschiedliche Dominanz der ER in den kardialen Fibroblasten weiblicher und männlicher Ratten kann zu einer unterschiedlichen Regulation der Expression des gleichen Gens führen. Eine Interaktion von ER α oder ER β mit dem TF AP-1 entscheidet über eine negative oder positive Expressionsregulation des gleichen Gens. Die Wechselwirkung von ER α mit AP-1 kann zu einem Anstieg führen, wohingegen eine Interaktion von ER β mit AP-1 die mRNA-Expression des Zielgens reduziert.¹⁶⁴ Darüber hinaus konnte mit Zellkernproteinen aus dem Hypothalamus und der Hirnanhangdrüse, isoliert aus OVX und kastrierten Ratten, gezeigt werden, dass die Proteine mit unterschiedlicher Affinität an die AP-1- und ERE-Konsensussequenzen binden.^{156, 158} Nach E2-Behandlung der Tiere zeigten die Zellkernproteinen aus den OVX Ratten ein stärkeres Bandensignal als die Proteinen aus den kastrierten Ratten. Der verantwortliche Mechanismus ist bis jetzt noch nicht bekannt, könnte aber für geschlechterspezifische Unterschiede in der Genexpression verantwortlich sein.

Ein weiterer Grund für den geschlechterabhängigen Unterschied in der Regulation der mRNA-Expression von Kollagen I und III durch E2 wäre eine unterschiedliche Expression von Ko-Faktoren in den kardialen Fibroblasten der weiblichen und männlichen Ratten. Dieser Unterschied wurden bereits in der Hypophyse männlicher und weiblicher Ratten gezeigt.¹⁶⁵ Die Interaktion der ER mit bestimmten Ko-Faktoren ist essentiell bei der Vermittlung positiver oder negativer Regulationsmechanismen der Genexpression.¹⁶⁶ Neben den beschriebenen Unterschieden in der Quantität oder Aktivierung der ER sowie der Expression von Ko-Faktoren sind Differenzen in der Phosphorylierung von ER α und ER β sowie der Chromatinstruktur in weiblichen und männlichen Individuen als Ursache für die geschlechterabhängige Regulation der Genexpression durch E2 in Erwägung zu ziehen.¹⁵⁸

Des Weiteren ist die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege in den kardialen Fibroblasten weiblicher und männlicher Ratten denkbar. Untersuchungen in weiblichen und männlichen Mäusen zeigten eine geschlechterspezifische Regulation des Interleukin 6-Gens, basierend auf der Aktivierung zweier unterschiedlicher Signaltransduktionswege. So wurde in den weiblichen Mäusen das MyD88-Signalprotein aktiviert und in den männlichen Mäusen der *Steroid receptor coactivator* (Src) verstärkt phosphoryliert.¹⁶⁰ Das Src-Protein ist in der Aktivierung des MAPK

Signalweges durch E2 involviert.¹⁶⁷ In humanen Fibroblasten inhibierte E2 die transkriptionelle Aktivität des Kollagen I-Promotors durch die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges.¹⁶⁸ Diese Beobachtungen lassen eine geschlechterabhängige Aktivierung von Src mit nachfolgender gegensätzlicher Regulation der Kollagen I und III mRNA-Expression in den kardialen Fibroblasten vermuten.

Der regulierende Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression der Kollagene in den kardialen Fibroblasten der männlichen Ratten konnte durch den E2-Antagonisten ICI aufgehoben werden (Abb. 9B und 10B). Dieser Befund lässt vermuten, dass E2 seine Wirkung über die ER vermittelt. In den kardialen Fibroblasten der weiblichen Ratten wurde jedoch der inhibierende Effekt von E2 durch ICI nicht blockiert (Abb. 9A und 10A). Somit wäre vorstellbar, dass entweder ICI einen agonistischen Effekt auf die mRNA-Expression von Kollagen I und III hat oder E2 seinen Einfluss unabhängig von den ER ausübt. Möglicher Weise vermittelt E2 seine Wirkung über integrale Membranrezeptoren, sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR).¹⁶⁹ Zu dieser Rezeptoren-Familie gehört GPR30, der nach Bindung von E2 nicht nur in der Lage ist verschiedene zytoplasmatische Signalwege zu aktivieren,¹⁷⁰ sondern auch die Genexpression auf transkriptioneller Ebene beeinflussen kann.¹⁷¹ Die Vermutung, dass E2 seine Wirkung auf die mRNA-Expression von Kollagen I und III in den Zellen der weiblichen Ratten über GPR30 vermittelt, wird durch die Tatsache, dass ICI eine rein agonistische Wirkung auf diesen Rezeptor hat, unterstützt.^{171, 172} Da jedoch in anderen Zelllinien ebenfalls über eine agonistische Wirkung von ICI auf die ER berichtet wurde,^{139, 173} sollte man die zuvor genannten möglichen Regulationsmechanismen von E2, in Abhängigkeit der ER, in zukünftigen Untersuchungen nicht vernachlässigen.

Die vorliegende Arbeit weist erstmals eine Regulation der Kollagen I und III mRNA-Expression in kardialen Fibroblasten nach. Bisher wurde lediglich der Einfluss von E2 auf die Kollagenbiosynthese bzw. Proteinexpression von Kollagen I und III in kardialen Rattenfibroblasten gezeigt.^{115, 146, 174} Dabei konnte für E2 eine reduzierende Wirkung auf die durch Angiotensin II induzierte Proteinexpression von Kollagen I und III in neonatalen Rattenfibroblasten¹⁴⁶ sowie auf eine serum-induzierte Kollagenbiosynthese in den Zellen aus adulten Ratten beobachtet werden.^{115, 174} Die Untersuchungen in adulten Ratten zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keine geschlechterabhängige Regulation der Kollagenbiosynthese durch E2 in den kardialen Fibroblasten weiblicher und männlicher Ratten. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der Verwendung unterschiedlicher Rattenstämme liegen. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurden in den genannten Studien keine Wistar Ratten, sondern Sprague-Dawley

Ratten untersucht. Über Unterschiede des Alters der Tiere kann keine Aussage getroffen werden, da dieses für die untersuchten Sprague-Dawley Ratten nicht angegeben wurde.

4.4 Reduktion der mRNA-Expression von MMP2 und MMP9 in kardialen Rattenfibroblasten durch 17 β -Estradiol

Nach E2-Behandlung der kardialen Fibroblasten konnte eine reduzierte MMP2 und MMP9 mRNA-Expression in den Zellen der weiblichen und männlichen Ratten beobachtet werden. ICI hob diesen Effekt auf, was einen Hinweis darauf liefert, dass E2 die Wirkung auf die mRNA-Expression über die ER vermittelt (Abb. 11 und 12). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass E2 eine Reduktion der mRNA-Expression beider MMP-Gene in kardialen Rattenfibroblasten hervorruft. Je nach Zell- oder Gewebetyp wurden bereits stimulierende oder inhibierende Wirkungen von E2 auf die Genexpression von MMP2 und MMP9 beschrieben.^{96-103, 105, 175-177} Der entsprechende Regulationsmechanismus über den E2 die Expression beider MMP-Gene reduziert wurde bis heute noch nicht identifiziert.

Der Promotor des MMP9-Gens weist kein ERE Element auf,¹⁰¹ enthält jedoch funktionelle Bindungsstellen für AP-1, NF- κ B, Sp1 sowie für die ETS-Familie.^{37, 178-180} Von diesen TF ist bekannt, dass sie durch die Interaktion mit den ER die Expression bestimmter Zielgene beeinflussen.¹¹⁰ Die Studie von Crowe *et al.* gibt einen Hinweis auf einen möglichen Regulationsmechanismus, über den E2 die MMP9 mRNA-Expression inhibieren kann.¹⁷⁹ Gezeigt wurde, dass ein durch E2 aktiviertes c-fos-ER Fusionsprotein die hMMP9-Promotor Aktivität reduziert. Die Autoren der genannten Studie spekulierten, dass dieser Effekt durch die Bindung des aktivierten Fusionsproteins an die putative AP-1 Bindungsstelle innerhalb des Promotors ermöglicht wurde, wiesen diese jedoch nicht nach. Vorstellbar ist, dass E2 seine inhibierende Wirkung auf die MMP9 mRNA-Expression in den kardialen Rattenfibroblasten ebenfalls über den TF AP-1 vermittelt. Eine vorhandene funktionelle AP-1 Bindungsstelle innerhalb der Promotorregion des Ratten MMP9-Gens¹⁸¹ lässt eine derartige Spekulation zu.

Obwohl E2-Behandlungen von MCF-7 Zellen, isolierten humanen Fibroblasten, einer humanen Prostatakrebs- und Epithelzelllinie eine reduzierte MMP2-Expression zeigten,⁹⁶⁻⁹⁹ gibt es bis heute keine Hinweise auf einen möglichen Regulationsmechanismus in der Literatur. Andere Studien, die eine stimulierende Wirkung von E2 auf die MMP2-Promotoraktivität, Proteinexpression und Enzymaktivität zeigten, geben einen Anhaltspunkt auf mögliche TF, die an der Regulation des MMP2-Gens beteiligt sind.^{102, 104, 105} Eine E2-Behandlung von MCF-7 Zellen zeigte

einen Anstieg der transkriptionellen Aktivität des hMMP2-Promotors.¹⁰⁴ Das Steroidhormon entfaltet seine Wirkung über ein am halbpalindromischen ERE gebundenen ER α (-1574bp, relativ zum Transkriptionsstart +1bp) sowie über eine stromabwärts liegende Sp1 Bindungsstelle (-1306bp, relativ zum Transkriptionsstart +1bp) innerhalb der Promotorsequenz. Marin-Castano *et al.* demonstrierten die Aufhebung der erhöhten MMP2-Enzymaktivität in humanen Epithelzellen nach der Behandlung mit E2 durch den spezifischen NF- κ B Blocker *Pyrrolidin-Dithiocarbamat*. Die Autoren schlussfolgerten einen durch NF- κ B vermittelten Effekt von E2.¹⁰⁵ Guccione *et al.* zeigten in ihrer Studie einen durch E2 hervorgerufener Anstieg der Proteinexpression von MMP2 und dem TF-AP-2 in Mesangialzellen.¹⁰² Anschließende EMSA-Untersuchungen zeigten ein verstärktes Bandensignal nach der Inkubation des AP-2 Konsensussequenz-Oligo mit dem Zellkernextrakt aus E2 behandelten Zellen. Nach Meinung der Autoren führt die verstärkte Interaktion des TF AP-2 am MMP2-Promotor zur Erhöhung der mRNA-Expression und somit zur erhöhten Proteinexpression. Die Bindung von AP-2 am MMP2-Promotor wurde jedoch nicht nachgewiesen. Untersuchungen von Mertens *et al.* und Quin *et al.* zur Regulation des MMP2-Promotors durch die Bindung des TF AP-2 untermauern diese Vermutung.^{53, 63, 182}

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bisher veröffentlichten Untersuchungen zur reduzierenden Wirkung von E2 auf die mRNA-Expression von MMP2 und MMP9 eine Vielzahl von Hinweisen auf mögliche Regulationsmechanismen geben. Der Nachweis, dass E2 die reduzierende Wirkung über eine Bindung der ER an die Promotoren beider MMP-Gene oder durch eine Interaktion mit bereits am Promotor gebundenen TF ausübt, wurde jedoch bislang noch nicht erbracht.

4.5 Inhibition der transkriptionellen Aktivität des humanen MMP2-Promotors in HT1080-Zellen durch 17 β -Estradiol

Um die reduzierende Wirkung von E2 auf die mRNA-Expression von MMP2 in den kardialen Rattenfibroblasten (Abb.11) besser zu verstehen, wurde in weiteren Analysen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Reduktion der MMP2 mRNA-Expression in Fibroblasten auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Dafür wurde der 5'-flankierende Bereich des hMMP2-Gens von -1174bp bis +88bp (relativ zum Translationsstart +1bp) mit Hilfe unterschiedlich langer hMMP2-Prom-Konstrukte in HT1080-Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Luc-Reporter-Assays zeigten, dass E2 die Promotoraktivität aller hMMP2-Prom-Konstrukte in Abhängigkeit

von ER α signifikant inhibiert (Abb. 13 und 14). Die regulatorische Region wurde auf den Bereich von -324bp bis -260bp (relativ zum Translationsstart +1bp) der hMMP2-Promotorsequenz eingegrenzt (Abb. 15). Innerhalb dieser Region konnte mit Hilfe computergestützter Analysen kein palindromisches oder halbpalindromisches ERE identifiziert werden. Es konnten jedoch mehrere potentielle Bindungsstellen für die TF Sp1, NF-1, Elk-1 und c-ETS-1, von denen eine Interaktion mit ER α bekannt ist oder deren Expression oder Aktivität durch E2 moduliert werden kann,^{122, 123, 183-185} identifiziert werden.

Charakteristisch für den TF Sp1 ist die Bindung an GC-reiche Stellen (GGGCGG-Motiv) sowie innerhalb von Promotoren ohne TATA-Box.¹⁸⁶ Der hMMP2-Promotor beinhaltet keine TATA-Box⁵¹ und die eingegrenzte Region ist zudem sehr GC-reich (Abb. 15). Diese Befunde deuten auf eine mögliche Bindung des TF Sp1 an die putativen Bindungsstellen in der Region zwischen -324bp und -287bp hin. Aus einer Studie von Porter *et al.* geht hervor, dass ER α und Sp1 direkt miteinander agieren können, wobei beide Proteine gemeinsam als Komplex an der GC-reichen Sequenz des Promotors vorliegen und nur Sp1 direkt an der Promotor-DNA bindet.¹⁸⁷ Mit zunehmender Menge an ER α verstärkt sich die Bindung von Sp1 an die GC-reiche Sequenz und resultiert in einem verstärkten Bandensignal im EMSA.¹⁵¹ Andere Untersuchungen zeigten in EMSA-Analysen ein verstärktes Bandensignal an der Sp1 Konsensussequenz nach E2-Behandlung.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ Diese Beobachtung beruht wahrscheinlich auf einer erhöhten Menge an ER α Protein nach E2-Behandlung und einer damit verbundenen verstärkten Interaktion zwischen Sp1 und ER α .¹⁹¹

In der vorliegenden Arbeit wurde in den EMSA-Analysen ein verstärktes Bandensignal mit E2-behandeltem HT1080-Zellkern beobachtet (Abb. 17). Diese Ergebnisse bestärkten die Vermutung, dass Sp1 und ER α gemeinsam in dem Bereich zwischen -324bp und -287bp innerhalb des hMMP2-Promotors gebunden vorlagen. Die Bindung des TF Sp1 innerhalb der eingegrenzten Region des hMMP2-Promotors konnte durch den spezifischen Sp1-AK nicht nachgewiesen werden (Abb. 18). EMSA-Untersuchungen mit zwei verschiedenen spezifischen ER α -AK sowie der Kombination aus AK gegen Sp1 und ER α präsentierten ebenfalls keinen *Super-Shift* (Abb. 18). Eine mögliche Erklärung ist, dass die jeweilige spezifische AK-Erkennungssequenz durch die Bindung von ER α an Sp1 maskiert war und somit eine Detektion von Sp1 und ER α verhindert wurde. Ein weiterer Grund könnte sein, dass in dem Komplex aus ER α und Sp1 weitere Ko-Faktoren vorliegen,¹⁹² die eine Detektion von Sp1 und ER α verhinderten. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das verstärkte Bandensignal nicht durch die Interaktion von Sp1 und ER α

hervorgerufen wurde. Die Rekrutierung noch unbekannter Ko-Faktoren durch den E2 aktivierten ER α ¹⁹³ oder die verstärkte Bindung eines unbekanntes DNA-bindenden TF an die hMMP2-Promotorsequenz könnte in einem verstärkten Bandensignal resultieren. Weiterführende Untersuchungen sollen die unbekanntes TF und Ko-Faktoren mit Hilfe der DNA-Protein-Affinitätschromatographie und anschließender Massenspektrometrie identifizieren. Nach Identifikation der unbekanntes Faktoren könnte mit Hilfe einer *Chromatin-Immunopräzipitation Analyse* nachgewiesen werden, ob sie nach Behandlung der HT1080-Zellen mit E2 an den hMMP2-Promotor rekrutiert werden.

4.5.1 Bindung des Transkriptionsfaktors Elk-1 innerhalb des humanen MMP2-Promotors

Parallel zu den Analysen der potentiellen Sp1-Bindungsstellen innerhalb der hMMP2-Promotorsequenz von -324bp bis -287bp wurden die putativen Bindungsstellen zwischen -296bp und -256bp untersucht. Mit Hilfe computergestützter Analysen wurden in diesem Bereich putative Bindungsstellen für die TF Elk-1 und c-ETS-1 identifiziert. Beide TF gehören zu der Familie der *ETS-Domain*-TF, die an Promotorsequenzen mit einem GGA-Motiv binden.¹⁹⁴ Die ETS-Familie bildet eine große und wichtigen Gruppe von Proteinen, die unter anderem die Expression extrazelluläre Matrixgene reguliert.¹⁹⁵ Die Aktivität dieser TF-Familie kann durch verschiedene Signalkaskaden moduliert oder durch die Interaktion mit anderen Ko-Faktoren beeinflusst werden.¹⁹⁶ Die Expression beider Proteine, c-ETS-1 und Elk-1, wird durch E2 moduliert.^{184, 185} Zudem wurde bereits in mehreren Arbeiten eine Phosphorylierung des TF Elk-1 durch den E2-gebundenen ER α beschrieben.¹²³⁻¹²⁵ Dies führt zu einer Rekrutierung von Ko-Aktivatoren oder -Repressoren,¹⁹⁷ wodurch die transkriptionelle Aktivität des Ziel-Promotors beeinflusst wird.^{198, 199} Auf Grund dieser Daten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob beide Formen des TF (Elk-1/p-Elk-1) an der eingegrenzten Region des hMMP2-Promotors binden. Die *Super-Shift* Analysen zeigten einen Shift des Protein-DNA-Komplexes durch den spezifischen Elk-1 AK unter basalen Bedingungen und nach E2-Behandlung (Abb. 19). Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis über eine Bindung von Elk-1 am hMMP2-Promotor im Bereich zwischen -296bp und -256bp erbracht. Die Untersuchungen der Bindung von p-Elk-1 ergab zwar keinen eindeutigen *Super-Shift*, jedoch eine Abschwächung der Signalintensität der zwei spezifischen Banden mit zunehmender AK-Menge (Abb. 20). Die Abnahme der Signalintensität könnte einen Hinweis darauf sein, dass die phosphorylierte Form von Elk-1 möglicher Weise an der putativen Bindungsstelle für Elk-1

innerhalb des hMMP2-Promotors nach E2-Behandlung bindet. Das Fehlen einer *Super-Shift* Bande könnte darin begründet sein, dass die Menge an p-Elk-1 zu gering war und dadurch die kritische Detektionsschwelle nicht erreicht wurde. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass aufgrund des geringeren Elk-1 Phosphorylierungsanteils nicht genügend p-Elk-1 vorhanden ist. Eine andere Erklärung wäre, dass die phosphorylierte Form von Elk-1 möglicherweise nicht lange stabil ist. Somit konnte der spezifische AK gegen die phosphorylierte Form nur eine geringe Menge des Protein-DNA-Komplexes shiften, was in einem sehr schwachen, nicht detektierbaren *Super-Shift* resultierte.²⁰⁰

Die erhaltenen Ergebnisse aus den WB-Analysen bestätigten die E2 vermittelte Phosphorylierung von Elk-1 und zeigen darüber hinaus, dass der signifikante Anstieg der Elk-1 Phosphorylierung über die ER vermittelt wird (Abb. 21). Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass die Phosphorylierung von Elk-1 analog zu der hemmenden Wirkung von E2 auf die hMMP2-Promotor-Aktivität in HT1080-Zellen ist. Dies lässt darauf schließen, dass die phosphorylierte Form des TF Elk-1 möglicherweise für die beobachtete signifikante Reduktion der hMMP2-Promotoraktivität verantwortlich ist.

4.5.2 Vermittlung der 17 β -Estradiol induzierten Reduktion der hMMP2-Promotor-Aktivität durch den MAP-Kinase Signalweg

Eine Vielzahl von Studien zeigten die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade durch E2 in verschiedenen Zelltypen.^{131, 201-204} Vier verschiedene MAPK-Gruppen sind in Säugerzellen beschrieben, zu denen ERK1 und 2, c-Jun N-terminale Kinasen (JNK 1,2 und 3), die p38 Isoform (α , β , γ und δ) und ERK 5 gehören.²⁰⁵ Für den TF Elk-1 ist eine Phosphorylierung über die drei MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und c-Jun bekannt,¹⁹⁶ wobei Elk-1 hauptsächlich über den ERK1/2-Signalweg, durch die Aktivierung von Ras/Raf, mit anschließender Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2, phosphoryliert und aktiviert wird¹²⁶ (siehe auch Abb. 25). In Anlehnung an diese Daten wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob in den HT1080-Zellen über diesen Signalweg die Phosphorylierung von Elk-1 durch E2 vermittelt wird. Hierfür wurde die Zellen mit dem spezifischen MAPK-ERK1/2 Inhibitor PD98059 behandelt, der die Phosphorylierung und Aktivität von MEK1/2 blockiert und dadurch die Aktivierung von ERK1/2 unterbindet. PD98059 hat keinen Einfluss auf andere Serin- und Threonin-Kinasen der MEKK-Familie und hemmt spezifisch den ERK1/2 Signalweg. In WB-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Elk-1 durch E2 durch PD98059 aufgehoben wurde (Abb. 22). Dieses Er-

gebnis weist nach, dass der MAPK-ERK1/2 Signalweg wesentlich an der E2 vermittelten Phosphorylierung von Elk-1 in den HT1080-Zellen beteiligt ist.

Weitere Untersuchungen zeigten die Aufhebung der reduzierenden Wirkung von E2 auf die hMMP2-Promotor-Aktivität durch die Blockierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges mit Hilfe von PD98059 (Abb. 23). Dieser Effekt ist vermutlich auf die Inhibition der E2-vermittelten Phosphorylierung von Elk-1 zurückzuführen. Die erhöhte Luc-Aktivität des ausschließlich mit PD98059 behandelten Ansatzes gegenüber der Kontrolle könnte durch die veränderte Aktivität eines anderen TF bedingt sein. Die verschiedenen MAPK regulieren die Expression einer Vielzahl von Genen, wobei sie nicht nur für die Veränderung der TF-Aktivität verantwortlich sind, sondern auch die intrazelluläre Lokalisation, die Proteinmenge, die Bindung an die Promotor-DNA sowie die Interaktion des TF mit anderen Ko-Regulatoren beeinflussen können.²⁰⁶ Folglich ist vorstellbar, dass die Blockierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges durch PD98059 die Aktivität eines TF, der ebenfalls an der Regulation der hMMP2-Promotor Aktivität beteiligt ist, verändert und eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des Promotors bewirkte.

Analog zur reduzierten hMMP2-Promotor-Aktivität (Abb. 13) ergab die Behandlung der HT1080-Zellen mit E2 eine signifikante Reduktion der endogenen hMMP2 mRNA-Expression (Abb. 24). Dieses Ergebnis untermauert nicht nur die inhibierende Wirkung von E2 auf die hMMP2-Genexpression, sondern bestätigte, dass E2 seine Wirkung auf die hMMP2 mRNA-Expression ebenfalls über die ER und die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges vermittelt. Eine erhöhte mRNA-Expression des hMMP2-Gens in den Zellen, die mit E2 und PD98059 sowie ausschließlich mit PD98059 behandelt wurden, könnte ebenfalls auf die veränderte Aktivität eines anderen TF zurückzuführen sein.

4.6 Hypothetisches Modell zum Einfluss von 17 β -Estradiol auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2-Promotors

Bekannt ist, dass E2 seine Wirkung auch über zytoplasmatische ER vermitteln kann, die nicht-transkriptionelle und transkriptionelle Effekte des Steroidhormons nach sich zieht.²⁰⁷ Dies kann unter anderem über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, wie zum Beispiel dem MAPK-Signalweg, geschehen.²⁰⁸ MAPK-Signalwege sind Kaskaden verschiedener Serin-Threonin- und Tyrosin-Kinasen, die in der Lage sind, extrazelluläre Stimulanzen in eine intrazelluläre Antwort umzuwandeln. Die Aktivierung der MAPK-Signalwege spielt dabei eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation eukaryontischer Gene. Einer der bedeu-

tendsten Mechanismen ist die Veränderung der Aktivität bestimmter TF, die infolgedessen die Transkription ihrer Zielgens modulieren.²⁰⁹ Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur Untersuchung des Einfluss von E2 auf die hMMP2-Promotor-Aktivität wird folgendes hypothetisches Modell postuliert (Abb. 25).

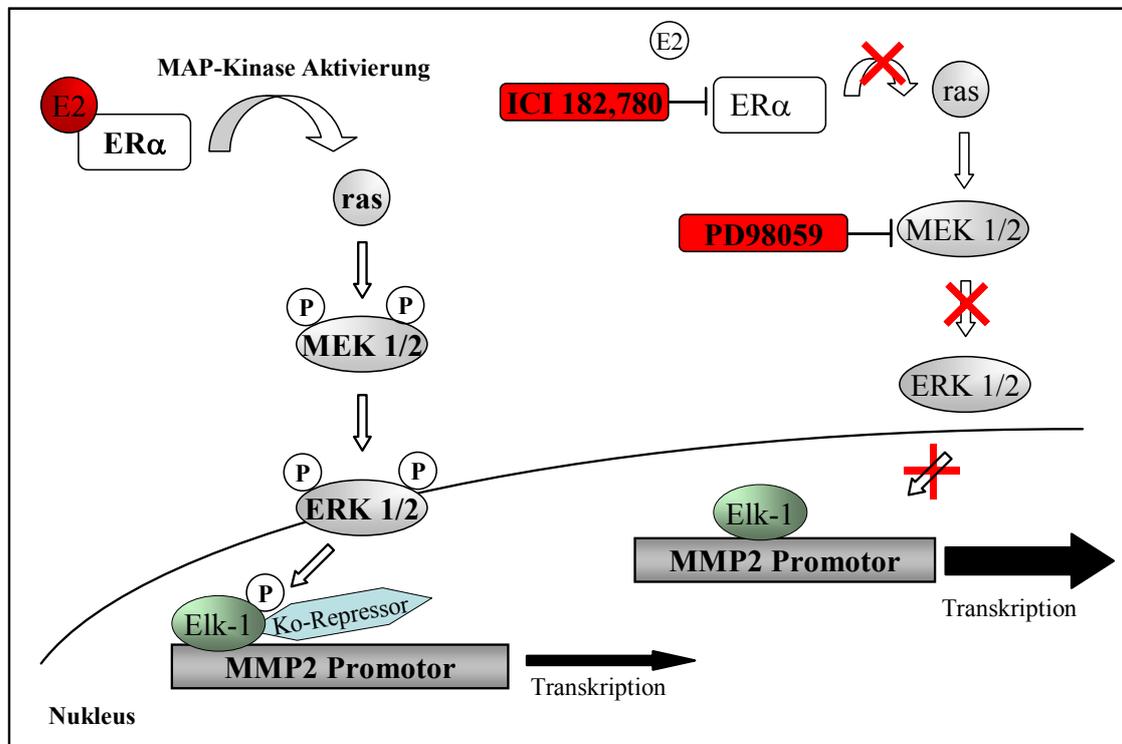


Abbildung 25: Hypothetisches Modell zum Einfluss von E2 auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2-Promotors. Dargestellt ist die Aktivierung des ER α durch E2, der darauf hin den MAPK-ERK1/2 Signalweg aktiviert. Nach der Aktivierung kommt es zu einer Translokation des phosphorylierten ERK1/2 in den Zellkern. Dort wird der gebundene TF Elk-1 durch ERK1/2 phosphoryliert, wodurch ein Ko-Repressor oder Ko-Repressor Komplex an den humanen MMP2-Promotor rekrutiert wird und die Promotor-Aktivität des hMMP2 Gens inhibiert. Der spezifische ER-Blocker ICI 182, 780 und der spezifische MAPK-ERK1/2 Inhibitor PD98059 sind in der Lage die E2-vermittelte Phosphorylierung von Elk-1 zu inhibieren, was wiederum die reduzierte humane MMP2-Promotraktivität aufhebt.

Nach Behandlung der HT1080-Zellen mit E2 bindet das Steroidhormon an den zytoplasmatischen ER α . Da ER α selbst nicht in der Lage ist andere Proteine zu phosphorylieren, muss der Rezeptor für die Weitergabe des E2-Signales mit dem Ko-Aktivator Src interagieren.¹⁶⁷ Infolgedessen wird das Adapterprotein Shc (*Src homology 2 containing protein*) phosphoryliert, was zur Formation des Shc-Grb2 (*Growth factor receptor binding protein 2*)-SOS (*son of evenless*) Komplexes führt.²¹⁰ Nach der Komplexbildung katalysiert SOS die Aktivierung des membranassoziierten Proteins Ras, was zur Weiterleitung des Signals durch die Phosphorylierung von Raf und MEK1/2 führt. Abschließend werden die zwei Isoformen ERK1 und ERK2 an ihren spezifischen Threonin- und Tyrosin-Seiten phosphoryliert und es kommt zur Translokation von

ERK1/2 vom Zytoplasma in den Zellkern,²¹¹ worauf sie das am hMMP2-Promotor gebundene Elk-1 phosphorylieren. Durch die MAPK-ERK1/2 Phosphorylierung von Elk-1 ändert der TF seine Konformation, bindet verstärkt an die Promotor-DNA und rekrutiert Ko-Aktivatoren oder -Repressoren.¹⁹⁷

Die Rekrutierung eines Ko-Repressor-Komplexes an das DNA-gebundene p-Elk-1 wurde für den Promotor des c-fos-Gens bereits in zwei Arbeiten beschrieben.^{199, 212} Yang *et al.* wiesen dabei die Interaktion von p-Elk-1 mit dem mSin3A-Histone Deacetylase Ko-Repressor Komplex (Sin3A/HDAC-1-Komplex) nach, was zur Repression der transkriptionellen Aktivität von c-fos durch Elk-1 führt.¹⁹⁹ Kukushkin *et al.* zeigte die direkte Assoziation zwischen p-Elk-1 und HDAC-1 und postulierten, dass die Rekrutierung von HDAC durch p-Elk-1 ausschlaggebend für die geringe transkriptionelle Aktivität des c-fos-Promotors ist.²¹² Ein ähnlicher Interaktionsmechanismus wäre auch für den hMMP2-Promotor vorstellbar, wobei die Enzymaktivität der HDACs eine Deazethylierung der Histone bedingt, die zur Kondensation der Chromatinstruktur führt und letztendlich die Genexpression unterdrückt.²¹³

5 Zusammenfassung

Klinische Daten sowie Studien an Tiermodellen zeigen geschlechterabhängige Unterschiede bei den myokardialen Umbauprozessen innerhalb der EZM während des pathologischen Remodelings. Dabei gaben die Untersuchungen Hinweise darauf, dass das Sexualhormon E2 die Expression und Aktivität wichtiger Vertreter der EZM, wie Kollagene und MMPs, im Herzen reguliert.

Um die beobachteten, geschlechterabhängigen Unterschiede während des kardialen Remodelings innerhalb der EZM besser zu verstehen, wurde in isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten weiblichen und männlichen Ratten untersucht, welchen Einfluss E2 auf die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixgene hat. Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Einfluss E2 auf ER α und ER β mRNA-Expression in den kardialen Fibroblasten hat. Die Behandlung der Fibroblasten mit E2 zeigte eine positive Regulation der ER α und ER β mRNA-Expression in den Zellen der weiblichen und männlichen Ratten. Es konnte gezeigt werden, dass E2 die mRNA-Expression von Kollagen I und III in den Zellen der weiblichen Ratten reduziert. Dagegen kam es in den Fibroblasten der männlichen Ratten, durch die Behandlung mit E2, zu einem Anstieg der mRNA-Expression beider Kollagentypen. Die mRNA-Expression von MMP2 und MMP9 wurde in den kardialen Fibroblasten beider Geschlechter durch E2 reduziert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, über welche Regulationsmechanismen E2 die transkriptionelle Aktivität des MMP2-Gens in Fibroblasten reguliert. Um diese Frage zu beantworten wurden unterschiedlich lange hMMP2-Prom-Konstrukte gemeinsam mit dem Expressionskonstrukt für ER α in HT1080-Zellen kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10^{-8} M E2 behandelt und mittels Luciferase-Reporter-Assays konnte eine reduzierte Aktivität der hMMP2-Prom-Konstrukte gemessen werden. Durch die Inkubation der Zellen mit dem E2-Antagonisten ICI konnte die inhibierende Wirkung von E2 aufgehoben werden. Der regulatorische Bereich, in dem E2 in Abhängigkeit von ER α seinen Einfluss ausübt, konnte durch die verschiedenen hMMP2-Prom-Konstrukte eingegrenzt werden. Mit Hilfe von EMSA-Analysen und dem Einsatz spezifischer Antikörper konnte die Bindung des TF Elk-1 innerhalb der eingegrenzten Promotorsequenz nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte ein Hinweis auf die Bindung der phosphorylierten Form von Elk-1, nach E2-Behandlung, erbracht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass E2 den TF Elk-1 nicht nur direkt über die ER, sondern auch über die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges phosphoryliert und seine inhibierende Wirkung auf die Promotoraktivität des hMMP2-Gens ebenfalls über diesen Signaltransduktionsweg vermittelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass E2 einen regulierenden Einfluss auf die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixgene Kollagen I und III sowie MMP2 und MMP9 in kardialen Fibroblasten hat. E2 reguliert dabei die mRNA-Expression von Kollagen I und III geschlechterabhängig und reduzierte die mRNA-Expression von MMP2 und MMP9 in den Fibroblasten beider Geschlechter. Die Expressionsanalysen der hMMP2-Prom-Konstrukte zeigten, dass der durch E2 aktivierte ER α in der Lage ist die Promotoraktivität des hMMP2-Gens zu inhibieren. Dabei vermittelt E2 seinen Effekt anscheinend durch die Phosphorylierung des am hMMP2-Promotor gebundenen TF Elk-1, dessen Phosphorylierung über die Aktivierung des MAPK-ERK1/2 Signalweges realisiert wird.

Literaturverzeichnis

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. Mar 1 2000;35(3):569-582.
2. Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, et al. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem*. Dec 22 1993;129(2):101-120.
3. Thomas DP, Zimmerman SD, Hansen TR, et al. Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training. *J Appl Physiol*. Oct 2000;89(4):1462-1468.
4. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. Jul 2000;15(4):264-272.
5. Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res*. Apr 1999;42(1):27-44.
6. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, et al. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:657-687.
7. Xu Q, Lekgabe ED, Gao XM, et al. Endogenous relaxin does not affect chronic pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Endocrinology*. Feb 2008;149(2):476-482.
8. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. Jan 1999;79(1):215-262.
9. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens*. Jan 2004;22(1):47-50.
10. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*. May 2000;46(2):264-268.
11. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, et al. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2006;69(3):604-613.
12. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. Dec 13 2002;91(12):1103-1113.
13. Bendall JK, Heymes C, Ratajczak P, et al. Extracellular matrix and cardiac remodelling. *Arch Mal Coeur Vaiss*. Dec 2002;95(12):1226-1229.
14. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*. Apr 1990;6(4):121-125.
15. Baudino TA, Carver W, Giles W, et al. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2006;291(3):H1015-1026.

16. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. Jan 1 2005;65(1):40-51.
17. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. Oct 1995;30(4):537-543.
18. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*. Jun 1989;13(7):1637-1652.
19. Corda S, Samuel JL, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev*. Jun 2000;5(2):119-130.
20. Shirwany A, Weber KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol*. Jul 4 2006;48(1):97-98.
21. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation*. Jan 2 2001;103(1):155-160.
22. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*. Mar 22 2002;90(5):520-530.
23. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, et al. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res*. May 2000;46(2):225-238.
24. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
25. Li YY, Feng YQ, Kadokami T, et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 7 2000;97(23):12746-12751.
26. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. May 2 2003;92(8):827-839.
27. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2006;69(3):562-573.
28. Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem*. May 12 1995;270(19):11555-11566.
29. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. Mar 17 1995;270(11):5872-5876.
30. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J*. May 1999;13(8):781-792.

31. Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, et al. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* Aug 17 2001;503(2-3):158-162.
32. Cleutjens JP, Creemers EE. Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail.* Dec 2002;8(6 Suppl):S344-348.
33. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* Jan 24 1997;272(4):2446-2451.
34. Weber KT, Sun Y, Cleutjens JP. Structural remodeling of the infarcted rat heart. *Exs.* 1996;76:489-499.
35. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* Jul 30 1999;274(31):21491-21494.
36. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* Oct 2007;87(4):1285-1342.
37. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem.* Jul 5 1990;265(19):11077-11082.
38. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:211-242.
39. Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem.* Sep 17 2004;279(38):39513-39519.
40. Fielitz J, Leuschner M, Zurbrugg HR, et al. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis. *J Mol Med.* Dec 2004;82(12):809-820.
41. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation.* Oct 17 2000;102(16):1944-1949.
42. Peterson JT, Li H, Dillon L, et al. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res.* May 2000;46(2):307-315.
43. Gaertner R, Jacob MP, Prunier F, et al. The plasminogen-MMP system is more activated in the scar than in viable myocardium 3 months post-MI in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 2005;38(1):193-204.
44. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, et al. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation.* May 4 2004;109(17):2143-2149.

45. Panek AN, Bader M. Matrix reloaded: the matrix metalloproteinase paradox. *Hypertension*. Apr 2006;47(4):640-641.
46. Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, et al. Targeted Deletion of Matrix Metalloproteinase 2 Ameliorates Myocardial Remodeling in Mice With Chronic Pressure Overload. *Hypertension*. Feb 27 2006.
47. Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, et al. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2007;292(4):H1847-1860.
48. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, et al. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. May 2004;50(2):87-100.
49. Mukherjee R, Herron AR, Lowry AS, et al. Selective induction of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in atrial and ventricular myocardium in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. Feb 15 2006;97(4):532-537.
50. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. Apr 2007;211(1):19-26.
51. Harendza S, Pollock AS, Mertens PR, et al. Tissue-specific enhancer-promoter interactions regulate high level constitutive expression of matrix metalloproteinase 2 by glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*. Aug 11 1995;270(32):18786-18796.
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. Qin H, Sun Y, Benveniste EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem*. Oct 8 1999;274(41):29130-29137.
54. Frisch SM, Morisaki JH. Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol Cell Biol*. Dec 1990;10(12):6524-6532.
55. Somasundaram K, Jayaraman G, Williams T, et al. Repression of a matrix metalloproteinase gene by E1A correlates with its ability to bind to cell type-specific transcription factor AP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 2 1996;93(7):3088-3093.
56. Bian J, Sun Y. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol*. Nov 1997;17(11):6330-6338.
57. Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, et al. Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol*. Feb 2006;28(2):487-496.
58. Harendza S, Lovett DH, Stahl RA. The hematopoietic transcription factor PU.1 represses gelatinase A transcription in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*. Jun 30 2000;275(26):19552-19559.

59. Bottles KD, Bullen EC, Updike DL, et al. Gelatinase A expression in endothelial cells is regulated by at least two cis-acting promoter elements. *Biochim Biophys Acta*. Aug 5 1999;1428(2-3):147-160.
60. Yan C, Wang H, Boyd DD. ATF3 represses 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) expression by antagonizing p53-dependent trans-activation of the collagenase promoter. *J Biol Chem*. Mar 29 2002;277(13):10804-10812.
61. Cheng S, Alfonso-Jaume MA, Mertens PR, et al. Tumour metastasis suppressor, nm23-beta, inhibits gelatinase A transcription by interference with transactivator Y-box protein-1 (YB-1). *Biochem J*. Sep 15 2002;366(Pt 3):807-816.
62. Bergman MR, Cheng S, Honbo N, et al. A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem J*. Feb 1 2003;369(Pt 3):485-496.
63. Mertens PR, Alfonso-Jaume MA, Steinmann K, et al. YB-1 regulation of the human and rat gelatinase A genes via similar enhancer elements. *J Am Soc Nephrol*. Dec 1999;10(12):2480-2487.
64. Mertens PR, Steinmann K, Alfonso-Jaume MA, et al. Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. *J Biol Chem*. Jul 12 2002;277(28):24875-24882.
65. Reisdorff J, En-Nia A, Stefanidis I, et al. Transcription factor Ets-1 regulates gelatinase a gene expression in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. Jun 2002;13(6):1568-1578.
66. Han X, Boyd PJ, Colgan S, et al. Transcriptional up-regulation of endothelial cell matrix metalloproteinase-2 in response to extracellular cues involves GATA-2. *J Biol Chem*. Nov 28 2003;278(48):47785-47791.
67. Liao Y, Cooper RS, Mensah GA, et al. Left ventricular hypertrophy has a greater impact on survival in women than in men. *Circulation*. Aug 15 1995;92(4):805-810.
68. Krumholz HM, Larson M, Levy D. Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol*. Aug 1 1993;72(3):310-313.
69. Weinberg EO, Thienelt CD, Katz SE, et al. Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. Jul 1999;34(1):264-273.
70. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. *J Card Fail*. Apr 2008;14(3):245-253.
71. van Eickels M, Patten RD, Aronovitz MJ, et al. 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. Jun 4 2003;41(11):2084-2092.
72. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, et al. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation*. Oct 1992;86(4):1099-1107.

73. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. May 2006;5(5):425-438.
74. Villari B, Campbell SE, Schneider J, et al. Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J*. Oct 1995;16(10):1410-1419.
75. Olivotto I, Maron MS, Adabag AS, et al. Gender-related differences in the clinical presentation and outcome of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. Aug 2 2005;46(3):480-487.
76. Varnava AM, Elliott PM, Sharma S, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart*. Nov 2000;84(5):476-482.
77. Litwin SE, Katz SE, Litwin CM, et al. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. *Cardiology*. 1999;91(3):173-183.
78. Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J Card Fail*. Apr 2002;8(2):101-107.
79. Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 2001;280(2):H674-683.
80. Cavasin MA, Yang XP, Liu YH, et al. Effects of ACE inhibitor, AT1 antagonist, and combined treatment in mice with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. Oct 2000;36(4):472-480.
81. Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, et al. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol*. Oct 1998;32(4):1118-1125.
82. Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, et al. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2003;284(5):H1560-1569.
83. Cavasin MA, Tao Z, Menon S, et al. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci*. Sep 17 2004;75(18):2181-2192.
84. Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, et al. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res*. Feb 2003;57(2):388-394.
85. Brower GL, Gardner JD, Janicki JS. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol Cell Biochem*. Sep 2003;251(1-2):89-95.
86. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. Mar 28 2006;113(12):1605-1614.

87. Zhan E, Keimig T, Xu J, et al. Dose-dependent cardiac effect of oestrogen replacement in mice post-myocardial infarction. *Exp Physiol*. Aug 2008;93(8):982-993.
88. Ernst M, Schmid C, Froesch ER. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1988;85(7):2307-2310.
89. Surazynski A, Jarzabek K, Haczynski J, et al. Differential effects of estradiol and raloxifene on collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Int J Mol Med*. Nov 2003;12(5):803-809.
90. Lee CY, Smith CL, Zhang X, et al. Tensile forces attenuate estrogen-stimulated collagen synthesis in the ACL. *Biochem Biophys Res Commun*. May 14 2004;317(4):1221-1225.
91. Lynen Jansen P, Rosch R, Rezvani M, et al. Hernia fibroblasts lack beta-estradiol-induced alterations of collagen gene expression. *BMC Cell Biol*. 2006;7:36.
92. Beldekas JC, Gerstenfeld L, Sonenshein GE, et al. Cell density and estradiol modulation of procollagen type III in cultured calf smooth muscle cells. *J Biol Chem*. Oct 25 1982;257(20):12252-12256.
93. Kwan G, Neugarten J, Sherman M, et al. Effects of sex hormones on mesangial cell proliferation and collagen synthesis. *Kidney Int*. Oct 1996;50(4):1173-1179.
94. Silbiger S, Lei J, Neugarten J. Estradiol suppresses type I collagen synthesis in mesangial cells via activation of activator protein-1. *Kidney Int*. Apr 1999;55(4):1268-1276.
95. Neugarten J, Medve I, Lei J, et al. Estradiol suppresses mesangial cell type I collagen synthesis via activation of the MAP kinase cascade. *Am J Physiol*. Dec 1999;277(6 Pt 2):F875-881.
96. Moalli PA, Klingensmith WL, Meyn LA, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression by estrogen in fibroblasts that are derived from the pelvic floor. *Am J Obstet Gynecol*. Jul 2002;187(1):72-79.
97. Kanagaraj P, Vijayababu MR, Ilangovan R, et al. Effect of 17beta-estradiol on apoptosis, IGF system components and gelatinases A and B in prostate cancer cells (PC-3). *Clin Chim Acta*. Feb 2007;377(1-2):70-78.
98. Suzuki T, Sullivan DA. Comparative effects of estrogen on matrix metalloproteinases and cytokines in immortalized and primary human corneal epithelial cell cultures. *Cornea*. May 2006;25(4):454-459.
99. Nilsson UW, Garvin S, Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. Oct 10 2006.
100. Potier M, Elliot SJ, Tack I, et al. Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J Am Soc Nephrol*. Feb 2001;12(2):241-251.

101. Potier M, Karl M, Zheng F, et al. Estrogen-related abnormalities in glomerulosclerosis-prone mice: reduced mesangial cell estrogen receptor expression and pro-sclerotic response to estrogens. *Am J Pathol*. May 2002;160(5):1877-1885.
102. Guccione M, Silbiger S, Lei J, et al. Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jan 2002;282(1):F164-169.
103. Wingrove CS, Garr E, Godsland IF, et al. 17beta-oestradiol enhances release of matrix metalloproteinase-2 from human vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. Mar 5 1998;1406(2):169-174.
104. Harendza S, Lovett DH, Panzer U, et al. Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. *J Biol Chem*. Jun 6 2003;278(23):20490-20499.
105. Marin-Castano ME, Elliot SJ, Potier M, et al. Regulation of estrogen receptors and MMP-2 expression by estrogens in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jan 2003;44(1):50-59.
106. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. Jul 2007;87(3):905-931.
107. 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.
108. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. Aug 2003;3(5):281-292.
109. Hyder SM, Chiappetta C, Stancel GM. Interaction of human estrogen receptors alpha and beta with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochem Pharmacol*. Mar 15 1999;57(6):597-601.
110. Wu F, Xu R, Martin J, et al. In Vivo Profiling of Estrogen Receptor/Specificity Protein-Dependent Transactivation. *Endocrinology*. Jul 17 2008.
111. Ho KJ, Liao JK. Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol Interv*. Jul 2002;2(4):219-228.
112. Mendelsohn ME. Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res*. Nov 24 2000;87(11):956-960.
113. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, et al. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem*. Dec 27 2002;277(52):50768-50775.
114. Neuss M, Regitz-Zagrosek V, Hildebrandt A, et al. Isolation and characterisation of human cardiac fibroblasts from explanted adult hearts. *Cell Tissue Res*. Oct 1996;286(1):145-153.
115. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, et al. 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension*. Jan 1998;31(1 Pt 2):522-528.

116. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* Aug 1 1991;51(15):3867-3873.
117. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* Jul 1994;26(7):809-820.
118. Agocha A, Sigel AV, Eghbali-Webb M. Characterization of adult human heart fibroblasts in culture: a comparative study of growth, proliferation and collagen production in human and rabbit cardiac fibroblasts and their response to transforming growth factor-beta1. *Cell Tissue Res.* Apr 1997;288(1):87-93.
119. Lu D, Kiriyaama Y, Lee KY, et al. Transcriptional regulation of the estrogen-inducible pS2 breast cancer marker gene by the ERR family of orphan nuclear receptors. *Cancer Res.* Sep 15 2001;61(18):6755-6761.
120. Nawata H, Chong MT, Bronzert D, et al. Estradiol-independent growth of a subline of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Biol Chem.* Jul 10 1981;256(13):6895-6902.
121. Vyhlidal C, Samudio I, Kladdé MP, et al. Transcriptional activation of transforming growth factor alpha by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site. *J Mol Endocrinol.* Jun 2000;24(3):329-338.
122. Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm.* 2001;62:231-252.
123. Duan R, Xie W, Burghardt RC, et al. Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J Biol Chem.* Apr 13 2001;276(15):11590-11598.
124. Hennessy BA, Harvey BJ, Healy V. 17beta-Estradiol rapidly stimulates c-fos expression via the MAPK pathway in T84 cells. *Mol Cell Endocrinol.* Jan 14 2005;229(1-2):39-47.
125. Chen CC, Lee WR, Safe S. Egr-1 is activated by 17beta-estradiol in MCF-7 cells by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of ELK-1. *J Cell Biochem.* Nov 15 2004;93(5):1063-1074.
126. Yamazaki Y, Kubota H, Nozaki M, et al. Transcriptional regulation of the cytosolic chaperonin theta subunit gene, Cctq, by Ets domain transcription factors Elk-1, Sap-1a, and Net in the absence of serum response factor. *J Biol Chem.* Aug 15 2003;278(33):30642-30651.
127. Eghbali M, Tomek R, Woods C, et al. Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 1 1991;88(3):795-799.
128. 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.

129. Watanabe T, Akishita M, He H, et al. 17 beta-estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. Nov 14 2003;311(2):454-459.
130. Mercier I, Colombo F, Mader S, et al. Ovarian hormones induce TGF-beta(3) and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2002;53(3):728-739.
131. Lee HW, Eghbali-Webb M. Estrogen enhances proliferative capacity of cardiac fibroblasts by estrogen receptor- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 1998;30(7):1359-1368.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. Robertson JA, Zhang Y, Ing NH. ICI 182,780 acts as a partial agonist and antagonist of estradiol effects in specific cells of the sheep uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Jun 2001;77(4-5):281-287.
140. Howell A. Fulvestrant ('Faslodex'): current and future role in breast cancer management. *Crit Rev Oncol Hematol*. Mar 2006;57(3):265-273.
141. Webb P, Lopez GN, Greene GL, et al. The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. *Mol Endocrinol*. Feb 1992;6(2):157-167.
142. Corthesy B, Claret FX, Wahli W. Estrogen receptor level determines sex-specific in vitro transcription from the *Xenopus vitellogenin* promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 1990;87(20):7878-7882.

143. Friend KE, Ang LW, Shupnik MA. Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 9 1995;92(10):4367-4371.
144. Dougherty SM, Mazhawidza W, Bohn AR, et al. Gender difference in the activity but not expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*. Mar 2006;13(1):113-134.
145. Neugarten J, Acharya A, Lei J, et al. Selective estrogen receptor modulators suppress mesangial cell collagen synthesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug 2000;279(2):F309-318.
146. Zhou L, Shao Y, Huang Y, et al. 17beta-estradiol inhibits angiotensin II-induced collagen synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts via modulating angiotensin II receptors. *Eur J Pharmacol*. Jul 19 2007;567(3):186-192.
147. Chung KY, Agarwal A, Uitto J, et al. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. Feb 9 1996;271(6):3272-3278.
148. Chang E, Goldberg H. Requirements for transforming growth factor-beta regulation of the pro-alpha 2(I) collagen and plasminogen activator inhibitor-1 promoters. *J Biol Chem*. Mar 3 1995;270(9):4473-4477.
149. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. Mar 1997;138(3):863-870.
150. Ramirez F, Tanaka S, Bou-Gharios G. Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene (COL1A2), an informative model system to study fibrotic diseases. *Matrix Biol*. Aug 2006;25(6):365-372.
151. Saville B, Wormke M, Wang F, et al. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem*. Feb 25 2000;275(8):5379-5387.
152. Slack JL, Parker MI, Robinson VR, et al. Regulation of collagen I gene expression by ras. *Mol Cell Biol*. Oct 1992;12(10):4714-4723.
153. Sumiyoshi H, Matsuo N, Shin T, et al. Multifactor complex containing B element binding factor, BBF, and repressors regulate the human alpha 1(III) collagen gene (COL3A1). *Acta Med Okayama*. Jun 2006;60(3):181-189.
154. Lauber AH, Romano GJ, Pfaff DW. Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;40(1-3):53-62.
155. Romano GJ, Mobbs CV, Lauber A, et al. Differential regulation of proenkephalin gene expression by estrogen in the ventromedial hypothalamus of male and female rats: implications for the molecular basis of a sexually differentiated behavior. *Brain Res*. Dec 17 1990;536(1-2):63-68.

156. Zhu YS, Dellovade T, Pfaff DW. Gender-specific induction of pituitary RNA by estrogen and its modification by thyroid hormone. *J Neuroendocrinol*. May 1997;9(5):395-403.
157. Zhou J, Pfaff DW, Chen G. Sex differences in estrogenic regulation of neuronal activity in neonatal cultures of ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 11 2005;102(41):14907-14912.
158. Zhu YS, Pfaff DW. Differential regulation of AP-1 DNA binding activity in rat hypothalamus and pituitary by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res*. Mar 30 1998;55(1):115-125.
159. Griffin M, Lee HW, Zhao L, et al. Gender-related differences in proliferative response of cardiac fibroblasts to hypoxia: effects of estrogen. *Mol Cell Biochem*. Dec 2000;215(1-2):21-30.
160. Zheng R, Pan G, Thobe BM, et al. MyD88 and Src are differentially regulated in Kupffer cells of males and proestrus females following hypoxia. *Mol Med*. Apr-Jun 2006;12(4-6):65-73.
161. Zhao X, Eghbali-Webb M. Gender-related differences in basal and hypoxia-induced activation of signal transduction pathways controlling cell cycle progression and apoptosis, in cardiac fibroblasts. *Endocrine*. Jul 2002;18(2):137-145.
162. Malorni W, Straface E, Matarrese P, et al. Redox state and gender differences in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. Mar 5 2008;582(5):635-642.
163. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep*. Sep 2001;2(9):775-781.
164. Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*. Sep 5 1997;277(5331):1508-1510.
165. Pfaff DW, Kow LM, Zhu YS, et al. Hypothalamic cellular and molecular mechanisms helping to satisfy axiomatic requirements for reproduction. *J Neuroendocrinol*. May 1996;8(5):325-336.
166. Lee JW, Lee YC, Na SY, et al. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci*. Feb 2001;58(2):289-297.
167. Song RX, Zhang Z, Santen RJ. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab*. Oct 2005;16(8):347-353.
168. Reunanen N, Foschi M, Han J, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. Nov 3 2000;275(44):34634-34639.
169. Bologna CG, Revankar CM, Young SM, et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol*. Apr 2006;2(4):207-212.
170. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. Mar 11 2005;307(5715):1625-1630.

171. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, et al. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:165-190.
172. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology.* Feb 2005;146(2):624-632.
173. Wang MM, Traystman RJ, Hurn PD, et al. Non-classical regulation of estrogen receptor-alpha by ICI182,780. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Sep 2004;92(1-2):51-62.
174. Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, et al. Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of locally applied estradiol on cardiac fibroblast growth. *Hypertension.* Feb 2002;39(2 Pt 2):412-417.
175. Potier M, Karl M, Elliot SJ, et al. Response to sex hormones differs in atherosclerosis-susceptible and -resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Dec 2003;285(6):E1237-1245.
176. Glassberg MK, Elliot SJ, Fritz J, et al. Activation of the estrogen receptor contributes to the progression of pulmonary lymphangioleiomyomatosis via matrix metalloproteinase-induced cell invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab.* May 2008;93(5):1625-1633.
177. Tushaus L, Hopert AC, Strunck E, et al. Estrogenic and antiestrogenic regulation of MMP-2 and MMP-13 mRNA in RUCA-I endometrial tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* Jul 30 2003;198(1):99-106.
178. Rhee JW, Lee KW, Sohn WJ, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression and cell migration by NF-kappa B in response to CpG-oligodeoxynucleotides in RAW 264.7 cells. *Mol Immunol.* Feb 2007;44(6):1393-1400.
179. Crowe DL, Brown TN. Transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity by a c-fos/estrogen receptor fusion protein is mediated by the proximal AP-1 site of the MMP-9 promoter and correlates with reduced tumor cell invasion. *Neoplasia.* Oct 1999;1(4):368-372.
180. Himelstein BP, Lee EJ, Sato H, et al. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene.* Apr 24 1997;14(16):1995-1998.
181. Goruppi S, Patten RD, Force T, et al. Helix-loop-helix protein p8, a transcriptional regulator required for cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast matrix metalloproteinase induction. *Mol Cell Biol.* Feb 2007;27(3):993-1006.
182. Mertens PR, Harendza S, Pollock AS, et al. Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J Biol Chem.* Sep 5 1997;272(36):22905-22912.
183. Ricci MS, Toscano DG, Mattingly CJ, et al. Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J Biol Chem.* Feb 5 1999;274(6):3430-3438.
184. Hwang KC, Lee KH, Jang Y. Inhibition of MEK1,2/ERK mitogenic pathway by estrogen with antiproliferative properties in rat aortic smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jan 2002;80(1):85-90.

185. Lincoln DW, 2nd, Phillips PG, Bove K. Estrogen-induced Ets-1 promotes capillary formation in an in vitro tumor angiogenesis model. *Breast Cancer Res Treat.* Mar 2003;78(2):167-178.
186. Pugh BF, Tjian R. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell.* Jun 29 1990;61(7):1187-1197.
187. Porter W, Saville B, Hoivik D, et al. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* Oct 1997;11(11):1569-1580.
188. Itoh Y, Hayashi H, Miyazawa K, et al. 17beta-estradiol induces IL-1alpha gene expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through estrogen receptor alpha (ERalpha) and augmentation of transcriptional activity of Sp1 by dissociating histone deacetylase 2 from ERalpha. *J Immunol.* Mar 1 2007;178(5):3059-3066.
189. Krishnan V, Porter W, Santostefano M, et al. Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol.* Dec 1995;15(12):6710-6719.
190. Bruning JC, Lingohr P, Gillette J, et al. Estrogen receptor-alpha and Sp1 interact in the induction of the low density lipoprotein-receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Aug 2003;86(2):113-121.
191. Khan S, Barhoumi R, Burghardt R, et al. Molecular mechanism of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor/Sp1 cross talk in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* Sep 2006;20(9):2199-2214.
192. Dong J, Tsai-Morris CH, Dufau ML. A novel estradiol/estrogen receptor alpha-dependent transcriptional mechanism controls expression of the human prolactin receptor. *J Biol Chem.* Jul 7 2006;281(27):18825-18836.
193. Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev.* Feb 2004;25(1):45-71.
194. Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene.* Dec 18 2000;19(55):6533-6548.
195. Trojanowska M. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene.* Dec 18 2000;19(55):6464-6471.
196. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nov 2001;2(11):827-837.
197. Sharrocks AD. Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans.* Apr 2002;30(2):1-9.
198. Tsai EY, Falvo JV, Tsytsykova AV, et al. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol.* Aug 2000;20(16):6084-6094.

199. Yang SH, Vickers E, Brehm A, et al. Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1. *Mol Cell Biol.* Apr 2001;21(8):2802-2814.
200. Dong L, Wang W, Wang F, et al. Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. *J Biol Chem.* Nov 5 1999;274(45):32099-32107.
201. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* Feb 1999;103(3):401-406.
202. Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, et al. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res.* Oct 1 1996;56(19):4516-4521.
203. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J.* Mar 15 1996;15(6):1292-1300.
204. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, et al. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology.* Sep 1997;138(9):4030-4033.
205. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998;74:49-139.
206. Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan 2002;3(1):30-40.
207. Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, et al. Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol.* Sep 2008;22(9):2116-2127.
208. Zhang Z, Maier B, Santen RJ, et al. Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 28 2002;294(5):926-933.
209. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene.* Nov 27 2003;320:3-21.
210. Song RX, McPherson RA, Adam L, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol.* Jan 2002;16(1):116-127.
211. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, et al. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* Sep 17 1998;17(11 Reviews):1395-1413.
212. Kukushkin AN, Abramova MV, Svetlikova SB, et al. Downregulation of c-fos gene transcription in cells transformed by E1A and cHa-ras oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at c-fos promoter. *Oncogene.* Jan 24 2002;21(5):719-730.

- 213.** Ng HH, Bird A. Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem Sci.* Mar 2000;25(3):121-126.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1A-D:	Charakterisierung der isolierten kardialen Fibroblasten mittels Immunofluoreszenz.....	42
Abbildung 2:	Expression von ER α und ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten.....	43
Abbildung 3A-L:	Expression und Lokalisation von ER α in isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten.	44
Abbildung 4A-L:	Expression und Lokalisation von ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus adulten Ratten.	46
Abbildung 5:	Relative mRNA-Expression von ER α in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten nach E2-Behandlung.....	47
Abbildung 6:	Relative mRNA-Expression von ER α in isolierten kardialen Fibroblasten aus männlichen Ratten nach E2-Behandlung.....	48
Abbildung 7:	Relative mRNA-Expression von ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen Ratten nach E2-Behandlung.....	49
Abbildung 8:	Relative mRNA-Expression von ER β in isolierten kardialen Fibroblasten aus männlichen Ratten nach E2-Behandlung.....	50
Abbildung 9A-B:	Relative mRNA-Expression von Kollagen I in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung	51
Abbildung 10A-B:	Relative mRNA-Expression von Kollagen III in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung	52
Abbildung 11A-B:	Relative mRNA-Expression von MMP2 in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung	53
Abbildung 12A-B:	Relative mRNA-Expression von MMP9 in isolierten kardialen Fibroblasten aus weiblichen und männlichen Ratten nach E2-Behandlung	54
Abbildung 13:	Relative Luc-Aktivität der hMMP2-Promotor-Konstrukte nach E2-Behandlung	57
Abbildung 14:	Relative Luc-Aktivität des hMMP2-417-pGL2 Konstrukt nach E2- und ICI-Behandlung.....	58
Abbildung 15:	Darstellung der eingegrenzten Sequenz des humanen MMP2-Promotors und der putativen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren ..	60

Abbildung 16:	Lage der synthetisierten Oligonukleotide innerhalb der eingegrenzten hMMP2-Promotor-Region von -324bp bis -256bp (in Bezug zum Translationsstart +1bp).....	60
Abbildung 17:	Analyse der putativen Bindungsstellen von -324bp bis -287bp innerhalb des hMMP2 Promotors	62
Abbildung 18:	Untersuchungen zur Bindung von Sp1 und ER α am hMMP2-Promotor im Bereich von -324bp bis -287bp (relativ zum Translationsstart+1bp)	64
Abbildung 19:	Untersuchung zur Bindung des TF Elk-1 an der putativen Elk-1 Bindungsstelle	65
Abbildung 20:	Analyse der Bindung des phosphorylierten Elk-1 Proteins an der putativen Elk-1 Bindungsstelle	67
Abbildung 21A-B:	Einfluss von E2 auf die Phosphorylierung von Elk-1 in HT1080-Zellen....	69
Abbildung 22 A-B:	Einfluss des MAPK-ERK1/2 Signalweges auf die E2-induzierte Phosphorylierung von Elk-1 in HT1080-Zellen	70
Abbildung 23:	Relative Luc-Aktivität des hMMP2-417-pGL2 Konstrukt nach E2-und PD98059 Behandlung	71
Abbildung 24:	Relative mRNA-Expression des endogenen hMMP2 Gens in HT1080-Zellen nach der Behandlung mit Dextrin, E2, ICI 182,780 und PD98059 ..	72
Abbildung 25:	Hypothetisches Modell zum Einfluss von E2 auf die transkriptionelle Aktivität des humanen MMP2-Promotors	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Laborgeräte	10
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien	11
Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper	12
Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper.....	12
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Medien für Bakterien	12
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Medien und Zusätze für die Zellkultur	13
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Plasmide	14
Tabelle 8: Verwendete humane MMP2-Promotor-Konstrukte.....	15
Tabelle 9: Übersicht der genspezifischen Ratten-Primer für die Real-Time PCR.....	16
Tabelle 10: Übersicht der genspezifischen Ratten-Primer für die PCR.....	17
Tabelle 11: Übersicht der genspezifischen humanen Primer für die Real-Time PCR.....	17
Tabelle 12: Übersicht der genspezifischen Primer für die PCR.....	18
Tabelle 13: Verwendete synthetisierte Oligonukleotide für den EMSA.....	18
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten kommerziell erworbenen Kits.....	18
Tabelle 15: Übersicht der verwendeten DNA-Längenstandards und Protein-Längenmarker	19
Tabelle 16: PCR-Bedingungen.....	29
Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die Real-Time PCR	31
Tabelle 18: Übersicht der in den Western Blot Analysen verwendeten Antikörper	38

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Elke Dworatzek, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Untersuchungen zum Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Expression extrazellulärer Matrixgene in Fibroblasten‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

November 2008

Danksagung

Meinen ersten und besonderen Dank spreche ich gegenüber Frau Prof. Regitz-Zagrosek für die Bereitstellung des Themas, ihre Unterstützung und ihre kritischen Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit aus. Weiterhin möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die wissenschaftliche Ausbildung im Rahmen des von ihr geleiteten DFG-Graduiertenkollegs bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Urheberin der Margarete Ammon Stiftung, durch die die Abschlussfinanzierung meiner Arbeit ermöglicht wurde.

Ganz persönlich und herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Shokoufeh Mahmoodzadeh für das in mich gesetzte Vertrauen. Ihre wissenschaftliche Betreuung und menschliche Unterstützung sowie ihre Ideen und anregenden Diskussionen haben die vorliegende Arbeit und mein wissenschaftliches Interesse nachhaltig gefördert.

Mein besonderer Dank gilt meinen Mitstreitern Stephan Fritschka und Hang Pham für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und freundschaftliche Zusammenarbeit. Danke aber auch für die moralische Unterstützung und die gemeinsame Freude über gelungene Experimente und Erfolge.

Auch möchte ich mich herzlich bei Jonas Busch, Kathleen Cantow, Miriam Schanz, Joachim Leber, Eva Brozova, Britta Fielitz, Jenny Thomas und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die nette und gute Zusammenarbeit bedanken. Bedanken möchte ich mich auch bei Heiko Funke Kaiser, Jens Schacherl und Jana Reinemund für die anregenden Diskussionen und praktischen Ratschläge. Michael Fähling möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Aus persönlichen Gründen möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund Aljoscha für seine Geduld und Verständnis in den vergangenen Jahren bedanken. Seine Motivation und private Unterstützung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie für ihr Vertrauen sowie liebevolle Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

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

Publikationen

In Fachzeitschriften:

S. Mahmoodzadeh, **E. Dworatzek**, S. Fritschka, H. Pham, V. Regitz-Zagrosek
Inhibitory effect of 17 β -Estradiol on the human MMP2-Promoter via MAP-Kinase pathway in fibroblasts.
 (Manuskript in Arbeit)

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

Veröffentlichte Abstrakte:

S. Mahmoodzadeh, **E. Dworatzek**, V. Regitz-Zagrosek
Klonierung und funktionelle Analyse des Promotors des humanen Matrix-Metalloproteinase-2 Gens.
 Zeitschrift für Kardiologie 2005; 94: Suppl 1

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek
Characterization and functional analysis of the human MMP2-gene promoter
 Abstracts from the 10th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR). Hypertension. 46(4):813, October 2005

J. Busch, **E. Dworatzek**, J Thomas, J Dedio, E. Becher, V. Regitz-Zagrosek
Lysophosphatidic acid and the development of cardiac fibrosis
 Abstracts from the 10th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR). Hypertension. 46(4): 888-916, October 2005

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek
Down-Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Gene Expression by 17 β -Estradiol in HT1080 cells: A Promoter Based Analysis
 European Heart Journal (2007) 28 (Abstract Supplement), 423

Auszeichnung:

Best Poster in Basic Research: **E. Dworatzek**, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek
Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP) Gene Expression by 17 β -Estradiol in HT1080 Cells: A Promoter Based Analysis.
 4.Berliner Symposium Sex and Gender in Medicine, Berlin, 11-12 Oktober 2007

Kongressbeiträge:**Vorträge:**

S. Mahmoodzadeh, **E. Dworatzek**, V. Regitz-Zagrosek

Klonierung und funktionelle Analyse des Promotors des humanen Matrix-Metalloproteinase-2 Gens.

71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 31. März-2. April 2005

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Analysis of the Effect of E2 on the Human MMP2 Expression in HT1080 Cells: A Promoter Based Analysis.

APS Conference Sex Steroids and Gender in Cardiovascular-Renal Physiology and Pathophysiology, Austin, Texas, USA, 9-12. August 2007

Poster:

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Characterization and functional analysis of the human MMP2-gene promoter

10th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR), La Colle sur loup, Nizza, Frankreich, 14-16 Oktober 2005

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Characterization and functional analysis of the human MMP2-gene promoter

1. Internationales CCR Symposium, Berlin, 21-22. Oktober 2005

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Characterization and functional analysis of the human Matrix Metalloproteinase2 gene

1. Day of Science on the Molecular Basis of CVD (Joint Meeting of GK754-III and Cardiovasc), Berlin, 28. November 2006

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Analysis of the Effect of E2 on the Human MMP2 Expression in HT1080 Cells: A Promoter Based Analysis.

APS Conference Sex Steroids and Gender in Cardiovascular-Renal Physiology and Pathophysiology, Austin, Texas, USA, 9-12. August 2007

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Down-Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Gene Expression by 17 β -Estradiol in HT1080 cells: A Promoter Based Analysis

ECS Congress 2007, Wien, Österreich, 1-5. September 2007

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP) Gene Expression by 17 β -Estradiol in HT1080 Cells: A Promoter Based Analysis.

4. Berliner Symposium Sex and Gender in Medicine, Berlin, 11-12 Oktober 2007

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP2) Gene Expression by 17 β -Estradiol in HT1080 Cells: A Promoter Based Analysis.

2. Day of Science on the Molecular Basis of CVD (Joint Meeting of GK754-III and Cardiovasc), Berlin, 10.12.2007

E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, V. Regitz-Zagrosek

17 β -Estradiol down regulates the transcriptional activity of the human Matrix Metalloproteinase-2 promoter in HT1080 cells

3rd International Congress in Gender Medicine, Stockholm, Sweden, 12-14 September 2008