

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik Würzburg, König-Ludwig-Haus  
Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Maximilian Rudert

**Molekularbiologische Untersuchungen zum Östrogenrezeptor  $\beta$ ;  
die Expression untranslatierter Exons in zellulären Systemen**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius - Maximilians - Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Markus Pfeiffer  
aus Würzburg

Würzburg, Mai 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze  
Koreferent: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Lesch  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09. März 2011

Der Promovend ist Arzt

Gewidmet  
meiner Frau und meinen Kindern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Einführung in die Östrogene .....	1
1.2 Struktur der Östrogenrezeptoren .....	1
1.3 Wirkmechanismus der Östrogenrezeptoren .....	3
1.3.1 Klassischer Mechanismus .....	3
1.3.2 Sp1 Mechanismus .....	4
1.3.3 AP-1 Mechanismus .....	5
1.3.4 NFκB Hemmung .....	5
1.4 Physiologische Effekte durch Östrogenrezeptoren .....	6
1.4.1 Weibliche Fortpflanzungsorgane .....	6
1.4.2 Männliche Fortpflanzungsorgane .....	7
1.4.3 Skelettsystem .....	8
1.4.4 Kardiovaskuläres System .....	8
1.5 Das Östrogenrezeptor β Gen .....	9
1.6 Das System der untranslatierten Exons des Östrogenrezeptor β .....	11
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Lösungen und Puffer .....	14
2.1.2 Oligonukleotide (Primer) .....	14

2.1.3 Zelllinien .....	16
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Zellkultur .....	16
2.2.2 Differenzierung der MSC .....	17
2.2.3 Isolierung von totaler RNA .....	17
2.2.4 Konzentrationsbestimmung der RNA.....	18
2.2.5 Isolierung von polyA+ RNA.....	19
2.2.6 Reverse Transkription der RNA.....	19
2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	20
2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese .....	21
2.2.9 Sequenzierung.....	21
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Die genomische Organisation des ER<math>\beta</math>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Nachweis der Expression des ER<math>\beta</math>.....</b>	<b>25</b>
3.2.1 Etablierung einer PCR zum Nachweis des ER $\beta$ .....	25
3.2.2 Expression des ER $\beta$ in den Zelllinien .....	27
<b>3.3 Nachweis der Expression untranslatierter Exons .....</b>	<b>28</b>
3.3.1 Etablierung einer PCR zum Nachweis von untranslatierten Exons im Zellsystem SK-N-SH.....	28
3.3.2 Weitere Untersuchungen des Zellsystems SK-N-SH auf untranslatierte Exons .....	30
3.3.3 Kontroll-PCR für bisher nicht nachweisbare untranslatierte Exons ...	31
3.3.4 Untersuchung von hFOB auf untranslatierte Exons .....	33
3.3.5 Untersuchung von primären MSC auf die Expression untranslatierter Exons .....	36
3.3.6 Untersuchung von T/C28a2 auf die Expression untranslatierter Exons.....	39

<b>3.4 Expression von ER<math>\beta</math> während der Differenzierung von MSC</b> .....	39
3.4.1 Osteogene Differenzierung .....	39
3.4.2 Adipogene Differenzierung .....	40
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 Methodische Überlegungen</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 Nachweis des ER<math>\beta</math></b> .....	<b>43</b>
<b>4.3 Nachweis untranslatierter Exons des ER<math>\beta</math></b> .....	<b>44</b>
4.3.1 SK-N-SH .....	44
4.3.2 hFOB .....	45
4.3.3 MSC.....	46
4.3.4 T/C28a2 .....	47
<b>4.4 Nachweis des ER<math>\beta</math> während der Differenzierung mesenchymaler     Stammzellen</b> .....	<b>48</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>50</b>
<b>6 Abkürzungen</b> .....	<b>52</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>53</b>





# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Östrogene

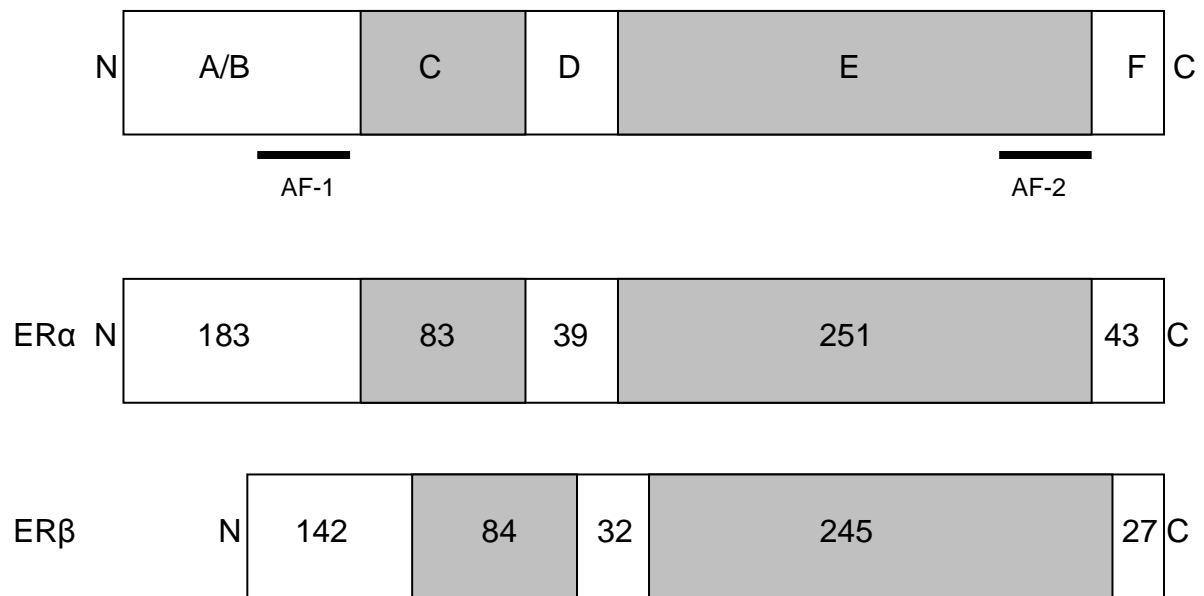
Östrogene spielen bei vielen physiologischen Vorgängen eine bedeutende Rolle. Diese beinhalten unter anderem Fortpflanzungsorgane, Knochenstoffwechsel, Immunsystem, Herzkranzgefäße und Gehirn. Durch die große Bandbreite der Wirkung auf die Physiologie des menschlichen Körpers verwundert auch ihr Einfluss auf die Entstehung und die Entwicklung verschiedenster Erkrankungen nicht. Hierzu zählen z.B. Knochenstoffwechselstörungen, verschiedene maligne Erkrankungen (Brust-, Ovarial-, Prostata-, Dickdarmkrebs), koronare Herzkrankheit, Insulinresistenz, autoimmune Erkrankungen und Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Bei vielen dieser Erkrankungen vermitteln die Östrogene (E<sub>2</sub>) ihre Wirkung durch die Östrogenrezeptoren (ER). Daraus ergibt sich oftmals eine Möglichkeit zum Ansatz einer Therapie. Bisher konnten zwei Östrogenrezeptoren kloniert werden (Östrogenrezeptor alpha und beta), die in einer Vielfalt von Isoformen im menschlichen Körper vorkommen.

## 1.2 Struktur der Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren gehören, wie auch Rezeptoren für Schilddrüsenhormone, Retinoidrezeptoren und verschiedene Rezeptoren ohne bekannte Liganden, zur Familie der zytoplasmatischen Rezeptoren. 1986 gelang es zwei Arbeitsgruppen den ersten Östrogenrezeptor zu klonieren (1;2). Zehn Jahre galt er als der einzige Östrogenrezeptor, bis 1996 ein zweiter Östrogenrezeptor kloniert wurde (3). Die Nomenklatur richtet sich seither nach der chronologischen Reihenfolge der Entdeckung: Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 1986 und Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) 1996.

Die Grundstruktur der Östrogenrezeptoren zeigt Gemeinsamkeiten mit der anderer zytoplasmatischer Rezeptoren. Sie setzt sich aus sechs funktionellen Domänen zusammen, die miteinander interagieren (Fig. 1): die N-terminale A/B-Domäne, die sehr variabel in ihrer Länge und Sequenz ist, aktiviert Zielgene durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren des Zellkerns (4). Diese Transkriptionsfunktion (AF-1) ist unabhängig von Liganden aber sehr spezifisch für bestimmte Promotoren und Zelltypen. Ihr schließt sich die C-Domäne mit ihrer DNA-bindenden Domäne an. Sie enthält zwei Zinkfinger und bindet mit hoher Affinität und Spezifität an EREs (estrogen responsive elements) im Bereich der Zielgene (5). Die D-Domäne ermöglicht dem Rezeptor, eine Konformationsänderung durchzuführen. Außerdem wird er benötigt um den Liganden mit maximaler Affinität zu binden (6). Die relativ große E-Domäne enthält die Liganden bindende Domäne (LBD), und bestimmt somit die Spezifität des Rezeptors gegenüber den Östrogenen. Sie enthält außerdem die Region, welche für eine Dimerbindung mit anderen Rezeptoren verantwortlich ist und eine zweite Transkriptionsfunktion (AF-2) (7). Die C-terminale F-Domäne hat innerhalb der Wirbeltieröstrogenrezeptoren eine große Variabilität. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Transkription und den hemmenden Effekten der Antiöstrogene. Außerdem stabilisiert sie die Struktur des Östrogenrezeptors (8).

Fig. 1: Schematischer Vergleich der Domänenstruktur von ER $\alpha$  und ER $\beta$



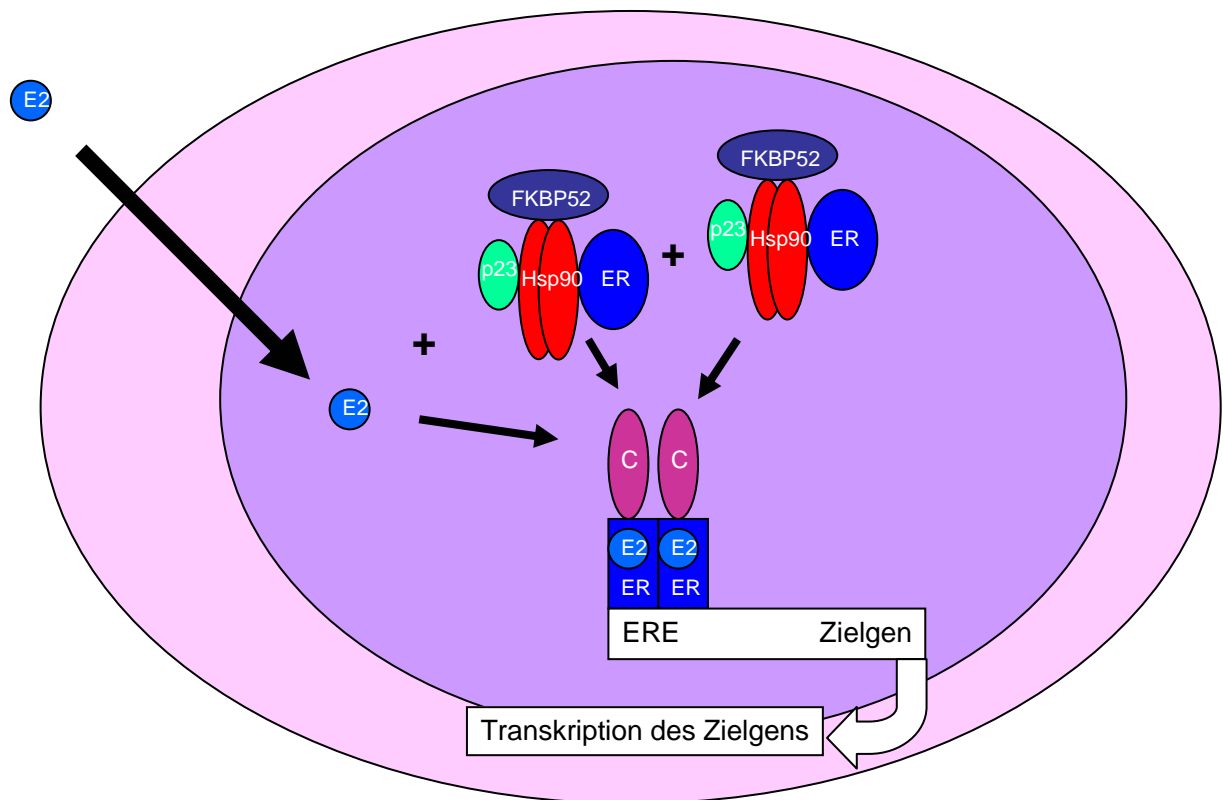
Der Rezeptor besteht aus sechs Domänen A-F. Für beide Rezeptoren sind jeweils die Anzahl der Aminosäuren in den Domänen aufgeführt. AF-1 und AF-2 markieren die Bereiche mit Transkriptionsfunktionen. Der Grad der Übereinstimmung der Domänen C und E zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  beträgt 97% bzw. 60% (9).

## 1.3 Wirkmechanismus der Östrogenrezeptoren

### 1.3.1 Klassischer Mechanismus

Das klassische Modell der Wirkweise von Östrogenrezeptoren geht davon aus, dass der Rezeptor als Monomer vorliegt (Fig. 2). Er bildet zusammen mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinen einen Multiproteinkomplex. Die Bindung von Östrogen führt zu einer Dissoziation des Multiproteinkomplexes und zu einer Dimerbildung der Östrogenrezeptoren. Die Dimerbildung ist entscheidend für eine stabile Bindung an die DNA und kann sowohl aus zwei gleichen Östrogenrezeptoren (Homodimer) oder verschiedenen Östrogenrezeptoren (Heterodimer) bestehen. Durch die von der Ligandenbindung induzierte Konformationsänderung des Rezeptors werden hydrophobe Bindungsstellen für Co-Aktivatoren freigelegt. Diese verändern die Chromatinstruktur des Zielpromotors und aktivieren die Transkriptionsfaktoren im Zellkern (10).

Fig. 2: Klassisches Modell der Östrogenwirkung



Durch Ligandenbindung (E2) dissoziiert der Multiproteinkomplex. Die ER bilden Dimere und aktivieren nach Bindung von Co-Faktoren (C) die Transkription.

Vergleiche der Promotorregionen, an welche die Dimere binden, zeigen eine Gemeinsamkeit dieser ERE. Sie bestehen aus Palindromen, die durch drei Basenpaare getrennt sind (5'AGGTCAnnnTGACCT3'). An jedes Teilelemente dieses Palindroms bindet ein Östrogenrezeptor, wobei die Sequenz und die Anordnung entscheidend für die Affinität und die Spezifität der Östrogenrezeptoren sind (11).

### 1.3.2 Sp1 Mechanismus

Die Transkription von Zielgenen erfolgt nicht nur über die Bindung von Östrogenrezeptor-Dimeren an die ERE. Ein weiterer Mechanismus bedient sich des Transkriptionsfaktors Sp1. An Östrogenrezeptor-Zielgenen wurde eine große Anzahl AGGTCA-Elemente zusammen mit GC-Boxen (GGGGCGGGG)

oder GT/CACCC Boxen (GGTGTGGGG) gefunden. Diese sind Bindungsstellen für Sp1. Das genaue Zusammenwirken von Östrogenrezeptoren und Sp1 ist zurzeit noch unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den ERE oder den Boxen zu einem Verlust der Transkription verschiedener Zielgene führen (12). Andererseits blieb nach kompletter Deletion des ERE die Transkription von Zielgenen weiterhin durch Östrogen beeinflussbar (13).

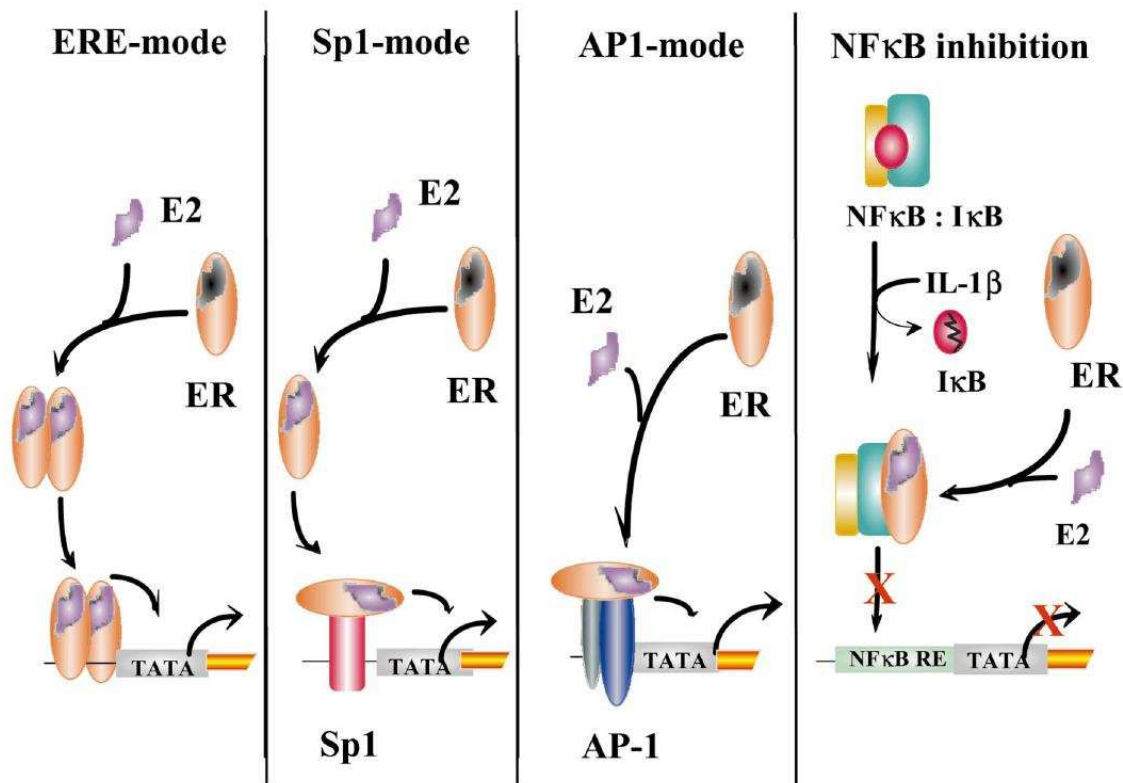
### **1.3.3 AP-1 Mechanismus**

Mit dem AP1-Mechanismus existiert eine weitere Möglichkeit, die Genexpression durch Östrogene zu beeinflussen, ohne dass eine direkte DNA-Bindung des Östrogenrezeptors nötig ist. AP-1 besteht aus einem Heterodimer von Transkriptionsfaktoren der Jun/Fos Familie. Die östrogenabhängige Aktivierung von Zielgenen ohne direkte Bindung an die DNA konnte mit Östrogenrezeptor-Mutanten nachgewiesen werden die keine DNA-Bindungsdomäne mehr hatten (14). Die Art der Wirkung auf die Transkription ist dabei abhängig von den Liganden und den Östrogenrezeptoren. So sind Liganden wie Östrogen, DES (Diethylstilbestrol) oder Tamoxifen im Zusammenspiel mit Östrogenrezeptor  $\alpha$  Agonisten im AP-1 Signalweg. Die Antiöstrogene Raloxifen und Tamoxifen entfalten in Verbindung mit Östrogenrezeptor  $\beta$  eine agonistische, Östrogen dagegen eine antagonistische Wirkung (15).

### **1.3.4 NF $\kappa$ B Hemmung**

Über diesen Mechanismus hemmen die Östrogenrezeptoren die Wirkung von Transkriptionsfaktoren, ohne dass eines der beteiligten Proteine direkten Kontakt zur DNA hat. Dadurch wird die Synthese von Interleukin 6 (IL-6) in Osteoblasten und Stammzellen des Knochenmarks verhindert, was den protektiven Effekt von Östrogenen auf die Knochendichte erklären könnte (16).

Fig. 3: Schematische Übersicht über die Verschiedenen Mechanismen zur Regulation der Transkription durch ER (17)



## 1.4 Physiologische Effekte durch Östrogenrezeptoren

Ausgelöst durch die Entdeckung der Östrogenrezeptoren in den 80er und 90er Jahren, wurden zur Erforschung der Funktion der Östrogenrezeptoren in der Physiologie Mausmodelle mit funktioneller Inaktivierung eines Östrogenrezeptor-Gens (ERKO) entwickelt. Es sind seit 1992 Östrogenrezeptor  $\alpha$  knockout Mäuse ( $\alpha$ ERKO) und seit 1998 Östrogenrezeptor  $\beta$  knockout Mäuse ( $\beta$ ERKO) verfügbar. Im folgendem werden die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen der Phänotypen der verschiedenen ERKO vorgestellt (Tab. 1).

### 1.4.1 Weibliche Fortpflanzungsorgane

Die weiblichen Fortpflanzungsorgane gehören im Zusammenhang mit Östrogenrezeptoren zu den am besten untersuchten Geweben überhaupt. Sie

entstehen während der embryonalen Entwicklung aus den Müllerschen Gängen. Untersuchungen von Tieren ohne Ovarien und Nebennieren haben gezeigt, dass die anatomische Entwicklung auch in Abwesenheit von Östrogenen ungestört ablaufen kann. Deshalb werden erst bei adulten ERKO verschiedene Phänotypen beobachtet.

- Uterus: bei  $\alpha$ ERKO sind zwar alle Uterusschichten (Myometrium, Endometrium, Epithel) angelegt, aber hypoplastisch. Der Uterus ist im Vergleich zum Wildtyp und  $\beta$ ERKO nur halb so groß und schwer (18).
- Vagina: die vaginale Mukosa unterliegt wie der Uterus dem ovariellen Zyklus. Bei  $\alpha$ ERKO sind die gleichen Effekte auf die Mukosa zu beobachten wie nach Ovariectomie oder einer Therapie mit Antiöstrogenen. Das Epithel verhornt und die Proliferationsrate nimmt ab (19). Die Mukosa von  $\beta$ ERKO zeigt eine normale Zyklusabhängigkeit.
- Eileiter: histologisch zeigen weder  $\alpha$ ERKO noch  $\beta$ ERKO Veränderungen der Eileiter. Eine Transportstörung wird bei  $\alpha$ ERKO vermutet, wurde aber bisher noch nicht untersucht.
- Ovarien: in den Ovarien von  $\alpha$ ERKO reifen funktionell normale Eizellen heran. Durch eine verhinderte Ovulation bekommen die Ovarien ein polyzystisches Aussehen und die  $\alpha$ ERKO bleiben durch den anovulatorischen Zyklus infertil (20). Die Ovulation und die Histologie bei  $\beta$ ERKO zeigt hingegen keine Auffälligkeiten. Trotzdem ist die Anzahl der Nachkommen verringert (21). Als Ursache wird eine Fehlfunktion bei der Implantation der Embryonen diskutiert.

#### **1.4.2 Männliche Fortpflanzungsorgane**

Wie auch die weiblichen Fortpflanzungsorgane entwickeln sich die männlichen aus den Müllerschen Gängen. Bei dieser Entwicklung spielen Androgene eine entscheidende Rolle, so dass auch hier sich die Organe bei ERKO unauffällig entwickeln. Adulte  $\alpha$ ERKO weisen Defizite in der Spermatogenese auf. Die Anzahl, sowie die Motilität der Spermien ist herabgesetzt (22).

### **1.4.3 Skelettsystem**

Der Zusammenhang zwischen Osteoporose und den niedrigen Östrogenspiegeln nach der weiblichen Menopause ist seit der Arbeit von Albright et al. (23) von 1947 bekannt. Die Hormonersatztherapie spielte lange Zeit eine entscheidende Rolle bei der Therapie der Osteoporose, welche aber auch unerwünschte Nebenwirkungen hatte, wie z.B. ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Vergleiche des Femur bei  $\alpha$ ERKO zeigten, dass dieser deutlich verkürzt ist und einen geringeren Durchmesser hat. Dieser Effekt ist bei weiblichen Mäusen stärker ausgeprägt als bei männlichen. Entgegengesetzt verhält sich die Mineralisation und Knochendichte, die bei männlichen Mäusen stärker abnimmt (24). Interessanterweise zeigen Migliaccio et al. (25) 1992, dass nach neonataler Exposition mit dem synthetischen Östrogen Diethylstilbestrol (DES) die Kortikalisdicke bei adulten weiblichen Mäusen zunimmt, während die Länge wie bei  $\alpha$ ERKO verringert ist. Diese Daten lassen vermuten, dass auch andere Signalwege eine Östrogenwirkung vermitteln.

### **1.4.4 Kardiovaskuläres System**

Kardiovaskuläre Erkrankungen werden mit vielen Risikofaktoren, zum Beispiel Diabetes mellitus, Übergewicht, Hypertonus und Hypercholesterinämie in Verbindung gebracht. Das geringere Risiko von Frauen kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln, wird Östrogenen zugeschrieben. Tatsächlich berichten Lundeen et al. (26), dass durch eine Östrogengabe bei Ratten der B/E LDL-Rezeptor stärker exprimiert ist, und somit LDL aus dem Blut in die Zellen aufgenommen wird.  $\alpha$ ERKO Mäuse zeigen diese Erhöhung des Rezeptors nach Östrogengabe nicht. Bei einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer Endothelverletzung die regelmäßige Gabe von Östrogen die Proliferation der glatten Muskelzellen und des Endothels hemmt (27). Da der Effekt auch bei  $\alpha$ ERKO Mäusen auftritt, wird die Vermittlung über Östrogenrezeptor  $\beta$  diskutiert.



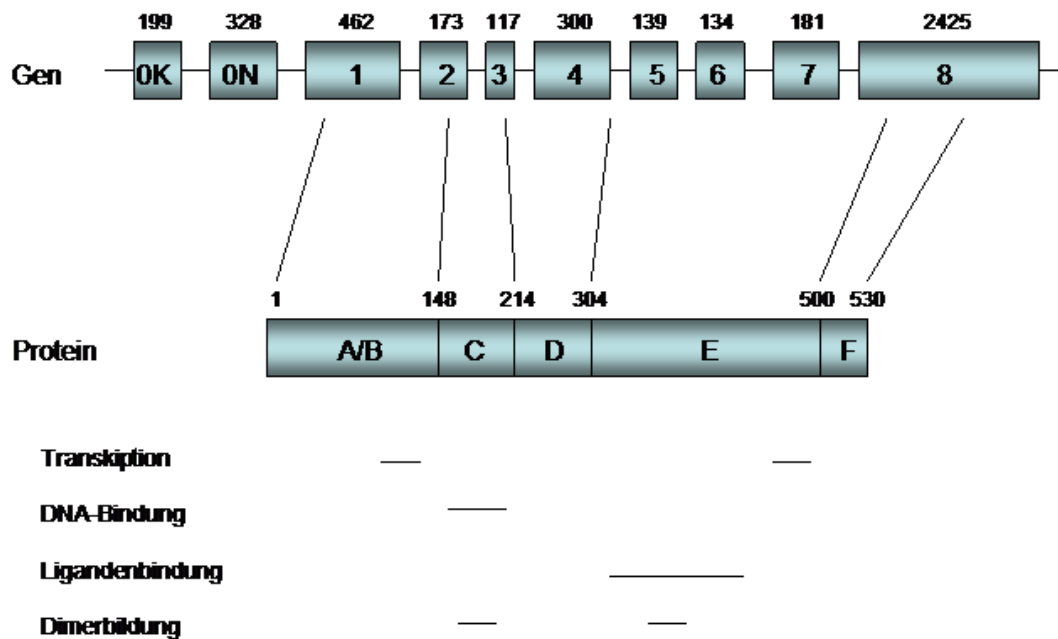
Tab. 1: Zusammenfassung der Phänotypen von ER knockout Mäusen

	$\alpha$ ERKO	$\beta$ ERKO
Uterus	hypoplastisch	evtl. Implantationsstörung
Vagina	atrophisch	-
Eileiter	evtl. Transportstörung	-
Ovarien	keine Ovulation	-
Hoden	Störung der Spermatogenese	-
Knochen/Skelett	Femur verkürzt, Durchmesser verkleinert	evtl. Störung des Epiphysenschlusses
Herz/Gefäße	keine Senkung des LDL durch E2 möglich	evtl. Hyperproliferation bei Endothelschäden

## 1.5 Das Östrogenrezeptor $\beta$ Gen

Die Gene für Östrogenrezeptor  $\alpha$  und Östrogenrezeptor  $\beta$  liegen auf verschiedenen Chromosomen, woraus darauf geschlossen werden kann, dass es sich trotz aller Gemeinsamkeiten um verschiedene Rezeptoren handelt. Die menschliche Östrogenrezeptor  $\beta$  DNA kodiert ein Protein aus 530 Aminosäuren. Fig. 4 zeigt eine Übersicht der Struktur von Gen und Protein. Das Gen besteht aus Exons und Introns. Die Kästchen markieren in der Abbildung die Exons, die Linien die Introns. In den Kästchen des Proteins sind schematisch die Domänen des Rezeptors vermerkt. Die Zahlen zeigen die Übergänge der Domänen anhand der Anzahl der Aminosäuren im Protein.

Fig. 4: Struktur des menschlichen ER $\beta$



Die Abbildung zeigt die Struktur des ER $\beta$  Gens, des Proteins, sowie die funktionellen Domänen. Die Exons werden durch Rechtecke, die Introns durch Linien dargestellt. Die Exons 0K und 0N bezeichnen die ersten entdeckten untranslatierten Exons (28). Die Größe der Exons ist in Bp angegeben. Die Linien zwischen Gen und Protein veranschaulichen die Grenzen der funktionellen Domänen. Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der Aminosäuren im Protein.

Zusätzlich zur Wildtyp mRNA des Östrogenrezeptor  $\beta$  existieren zahlreiche Isoformen, die durch folgende Mechanismen entstehen können (29-32):

- Ein oder mehrere Exons werden bei der Transkription übersprungen (z.B. del.5, del.6, del.5+6, del.2, del.2+5+6, del.3, del.4, del.2+5, del.2+6, del.2+3+6 (33)). Die biologische Funktion dieser Isoformen ist bisher ungeklärt.
- Es werden verschiedene 5'-untranslatierte Exons zusätzlich transkribiert. Bei diesen Isoformen ändert sich am Protein des Östrogenrezeptor  $\beta$  nichts, da der offene Leserahmen für die Translation gleich bleibt. Es wird vermutet, dass über dieses System der untranslatierten Exons die

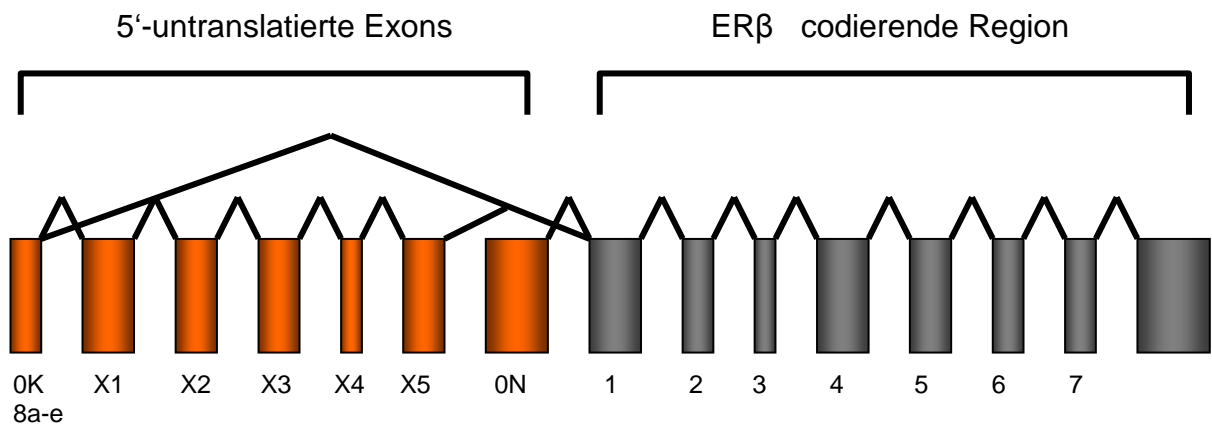
gewebespezifische Expression der Östrogenrezeptoren reguliert wird (34).

- Es werden unterschiedliche kodierende Exons verwendet. Zusätzlich zum Wildtyp des Östrogenrezeptors, der aus den Exons 1-7 und 8b besteht, existieren weitere vier Isoformen des Exon 8 (a,c,d,e) (35); die  $\beta 2$ -Isoform (auch ER $\beta$ cx) enthält Exon 8d,  $\beta 3$  enthält Exon 8e,  $\beta 4$  enthält Exon 8c+d,  $\beta 5$  enthält Exon 8a. Da diese Exons das C-terminale Ende des Rezeptors kodieren, unterscheidet sich das Protein vom Wildtyp. Die  $\beta 2$ -Isoform ist gut erforscht und es wurde berichtet, dass sie als Heterodimer mit dem Wildtyp dessen Funktion suprimieren kann (36).
- Die mRNA besteht aus einem „intrinsic“ Exon M und den kodierenden Exons 4 bis 8. Die biologische Funktion ist nicht erforscht. Aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten mit Östrogenrezeptor  $\alpha$  Isoformen wird eine ähnliche Funktion vermutet (37).

## **1.6 Das System der untranslatierten Exons des Östrogenrezeptor $\beta$**

Durch Untersuchungen des Östrogenrezeptor  $\alpha$  ist bekannt, dass die Transkription dieses Rezeptors durch mehr als nur einen Promotor gesteuert werden kann (38). Um den Mechanismus der Expression des Östrogenrezeptor  $\beta$  zu verstehen, wurde ebenfalls die 5'-Region der cDNA des Östrogenrezeptor  $\beta$  näher untersucht. Dabei wurden zunächst zwei Isoformen des Östrogenrezeptor  $\beta$  mit verschiedenen Startpunkten für die Transkription entdeckt (28). Bisher sind sieben dieser Startpunkte bekannt (Fig. 5). Es wird vermutet, dass ihnen eine entscheidende Rolle bei der gewebetypischen Expression des Östrogenrezeptor  $\beta$  zukommt.

Fig. 5: System der untranslatierten Exons des ER $\beta$



In der Abbildung sind rechts schematisch die für das Protein kodierenden Exons dargestellt. Davor befinden sich sieben bislang bekannte untranslatierte Exons. Die Verbindungslinien oberhalb der Exons zeigen die bisher bekannten Kombinationsmöglichkeiten der Exons.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Existenz von untranslatierten Exons in Hodenzellen nachgewiesen, die nicht für das Protein des Östrogenrezeptor  $\beta$  kodieren (39). Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass es mindestens sieben dieser Exons gibt (37). Diese Arbeiten basierten auf der Untersuchung von menschlichen Endometrium- und Leberzellen.

In dieser Arbeit sollte das Auftreten von untranslatierten Exons des Östrogenrezeptor  $\beta$  in mesenchymalen Stammzellen (MSC), humanen fetalen Osteoblasten (hFOB), Neuroblastomzellen (SK-N-SH) und Chondrozyten (T/C28a2) untersucht werden. Es sollte des weiteren geklärt werden, ob es gewebespezifische Unterschiede in den Transkriptionsstartpunkten gibt und ob sich während der osteogenen oder adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen quantitative oder qualitative Unterschiede in der Expression von Östrogenrezeptor  $\beta$  zeigen.

Für die Untersuchungen sollte RNA aus den verschiedenen Zellen isoliert und cDNA hergestellt werden. Danach wurde eine PCR etabliert mit der die

gewonnenen cDNAs auf die Existenz untranslatierter Exons untersucht werden sollten.

Im Anschluss wurde die cDNA von mesenchymalen Stammzellen in verschiedenen Stufen der Differenzierung mittels PCR auf qualitative und quantitative Unterschiede in der Expression von Östrogenrezeptor  $\beta$  untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Plastikwaren wurden von Eppendorf, Falcon, Greiner und Sarstedt bezogen. Chemikalien wurden von Life Technologies, Merck, Roche Molecular Biochemicals, Roth oder Sigma bezogen und waren von p.A.-Qualität. Lösungen wurden je nach benötigter Reinheit mit deionisiertem Wasser, doppelt destilliertem, deionisiertem Wasser (Bidest) oder mit sterilem, RNase-freiem Aqua ad injectabilia (Ampuva) von Boehringer-Ingelheim angesetzt.

#### 2.1.1 Lösungen und Puffer

TE (10 mM Tris -HCl, 1 mM EDTA pH 8,0)

TBE (0,09 M Tris-Borat, 0,002 M EDTA)

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na HPO<sub>4</sub> , pH 7,4)

Farbmarker für Agarosegele (Stop-Puffer) [5-fach konzentriert: 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v), 30 % Glycerin (w/v), 1 mM EDTA]

#### 2.1.2 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG bezogen. Folgende Oligonukleotide wurden für PCR, nested-PCR und Sequenzierung verwendet:

Tab. 2: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 3'- 5'	Position (vgl. Fig.6)	Genbankeintrag
Ex1for2	cagcattcccagcaatgtcac	1822 - 1842	AF124790
Ex2for1	agagacactgaaaaggaaggtag	2017 - 2040	AF124790
Ex4rev1	gacgagcagctgcactgtgcc	2360 - 2380	AF124790
Ex2rev2	ctgcgctgtctgcagcgattac	2098 - 2119	AF124790
Ex1rev2	tatcacatctgtatgcggaacctc	1938 - 1961	AF124790
Ex2rev1	ggccaggtcaaagagggatgc	2069 - 2091	AF124790
Ex3rev1	gcaagagctgccaggcctgccgact	2247 - 2271	AF124790
RTER $\beta$ 1/7F	tggccccttgagttac	110 - 125	AB006589
Ex0X5for1	cgatgcctaggacactgcagtg	287 - 309	AL122035
RTER $\beta$ 3/7F	catcaacctgtgtggaaaaga	515 - 536	AF215937
RTER $\beta$ 4/7F	tctcccagccacaaggtag	708 - 727	AL161756
RTER $\beta$ 5/7F	ggacagacatgcctccattt	920 - 939	AF215937
Ex0X1for1	agatgtaagacatgcgctgtcc	1139 - 1160	AL161756
Ex0Nfor2	agctgcaggaggtgcgctcg	1436 - 1455	NM_001437
Ex0Kfor1	gctggaggaaccgcgctcaggttac	151 - 175	AB006589
ESRBE2BF	aggaaacaggagggaagattg	332 - 352	AL122035
Ex0X4for1	accactctctagcaggtgatccttg	567 - 592	AF215937
Ex0X3for1	agagcagatggaggtagttgtagc	738 - 762	AL161756
RTER $\beta$ 6/7F	ggagaaaacatgggatgtgc	973 - 992	AF215937
Ex0X1for2	tgcgctgtccaatcgagcgcag	1151 - 1173	AL161756
Ex0Nfor1	tagagaaggcaaggccggtgtg	1531 - 1552	NM_001437
2Ex0X4for1	tccaggactggagggtgaag	617 - 636	AF215937
2Ex0X4for2	cacatggattaaggagcgaga	665 - 685	AF215937
2Ex0X2for1	tgggctctacaggacagaca	909 - 928	AF215937
2Ex0X2for2	cagtgagaaaacatgggatg	969 - 989	AF215937
2Ex0X1for1	gggtgttatggacatggag	1111 - 1130	AL161756
2Ex0X1for2	agcgcaggtgtgttgacag	1167 - 1186	AL161756

Die Primer Ex2rev1, Ex3rev1, RTER $\beta$ 1/7F, Ex0X5for1, RTER $\beta$ 3/7F, RTER $\beta$ 4/7F, RTER $\beta$ 5/7F, Ex0X1for1, Ex0Nfor2, Ex0Kfor1, ESRBE2BF, Ex0X4for1, Ex0X3for1, RTER $\beta$ 6/7F, Ex0X1for2 und Ex0N1for1 wurden der Literatur entnommen. Die Primer 2Ex0X4for1, 2Ex0X4for2, 2Ex0X2for1, 2Ex0X2for2, 2Ex0X1for1 und 2Ex0X1for2 wurden anhand der Sequenz in Figur 6 ausgewählt.

### **2.1.3 Zelllinien**

Für die Untersuchungen wurden folgende Zelllinien verwendet:

- Primäre MSC: aus menschlichem Knochenmark gewonnene, primäre mesenchymale Stammzellen
- hFOB: Die Osteoblasten-Zelllinie hFOB wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Spelsberg, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen Klon humaner fetaler Osteoblasten, der durch eine temperatursensitive Mutante des SV-40 large T Antigens (tsA58) immortalisiert wurde (40).
- T/C28a2: Die Chondrozytenzelllinie T/C28a2 wurde uns von Dr. Mary B. Goldring, Harvard Institutes of Medicine, Boston zur Verfügung gestellt (41).
- SK-N-SH: Die Neuroblastomzelllinie entstammt einer Knochenmarksmetastase eines 4-jährigen Mädchens und wurde uns von P. Sand, Institut für Psychiatrie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die Zellen der Linie hFOB, SK-N-SH, T/C28a2 und MSC wurden zur Stammerhaltung in 25 cm<sup>3</sup> oder 75 cm<sup>3</sup> Gewebekulturflaschen kultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM/F12 Ham-Medium (PAA Laboratories GmbH) unter



Zugabe von 10 % fetalem Rinderserum, welches aktivkohlebehandelt und steril filtriert wurde und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % Umgebungsluft und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Eine Ausnahme bildeten die Zellen der Linie hFOB, die unter ansonsten gleichen Bedingungen bei 34 °C inkubiert wurden. Alle Zellen wurden jeden zweiten Tag routinemäßig einem Medienwechsel unterzogen und proliferierten bis zur visuell bestimmten Konfluenz. Am zweiten postkonfluenten Tag wurde die Ernte durchgeführt oder die Zellen zu weiteren Kultivierung 1:10 gesplittet.

### 2.2.2 Differenzierung der MSC

Um eine Differenzierung der MSC zu bewirken, wurde dem Kulturmedium (vergleiche Kapitel 2.2.1) folgende Zusätze beigefügt:

- Osteogene Differenzierung:

L-Ascorbicacid-2-phosphate	50 µg/ml
β-Glycerophosphat	10 mM
Dexamethason	100 nM
- Adipogene Differenzierung:

Dexamethason	1 µM
IBMX	500 µM
Insulin	1 µg/ml
Indomethacin	100 µM

Die Kulturbedingungen entsprechen dem in Kapitel 2.2.1. Die Ernte wurde bei der osteogenen Differenzierung jeweils nach einer Differenzierungszeit von 7, 14, 21 und 28 Tagen durchgeführt, bei der adipogenen Differenzierung nach 7 und 14 Tagen.

### 2.2.3 Isolierung von totaler RNA

Zur Isolierung der totalen RNA wurde ein RNeasy® Kit der Firma Qiagen verwendet. Sämtliche Materialien waren im Kit enthalten, mit Ausnahme des β-Mercaptoethanol und des Ethanol.

Zunächst wurde der RLT-Puffer (RLT) durch Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml RLT in einen gebrauchsfertigen Zustand versetzt.

Ebenso wurde mit dem RPE-Puffer (RPE) verfahren, dem laut Etikett 4 Volumina Ethanol (99 %) zugegeben wurde.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt in der Zellkulturflasche unter Zugabe von 600 µl RLT. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummiwischers von der Flasche gelöst und nach mehrmaligem auf- und abpipettieren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Homogenisieren der Probe wurde das Lysat fünfmal durch eine 20 Gauge Kanüle gedrückt. Anschließend wurde 600 µl Ethanol 70 % zugegeben und 700 µl der Probe auf eine RNeasy-Mini-Säule aufgetragen, die bei 8000 rpm für 15 s zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Waschen der Probe wurde 700 µl RW1-Puffer aufgetragen und wieder bei 8000 rpm für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 500 µl RPE zuerst für 15 s bei 8000 rpm, das zweite Mal für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen. Die Elution wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser bei 8000 rpm für 1 min durchgeführt.

Das Produkt der Isolierung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

#### **2.2.4 Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte photometrisch mit einem Eppendorf BioPhotometer® 6131 im entsprechenden RNA-Programm.

Die Messung erfolgte, nachdem 2 µl RNA-Isolat mit 48 µl RNase freiem Wasser verdünnt wurde und in eine Quarzküvette überführt wurde. Die Extinktion wurde bei 260 nm (Maximum für RNA) und 280 nm (Maximum für Proteine) gemessen. Der Quotient E260/E280 gibt die Reinheit der Probe an und sollte zwischen 1,6 und 2,1 liegen. Das Programm errechnete automatisch die Konzentration der RNA in µg/ml.

### **2.2.5 Isolierung von polyA+ RNA**

Die Isolierung der polyA+ RNA erfolgte mit Hilfe des Oligotex mRNA Midi Kit der Firma Qiagen. Nach Bestimmung der Gesamt-RNA Menge wurde entsprechend der Herstellervorgabe RNase freies Wasser, OBB Puffer und auf 37 °C erwärmte Oligotex Suspension zugegeben und vermischt. Die Probe wurde für 3 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für weitere 10 min auf 25 °C abgekühlt. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nach Vorgabe in OW2 Puffer aufgelöst, auf eine im Kit enthaltene Säule aufgetragen und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von OW2 Puffer und Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) wurde der Durchfluss verworfen. Das in der Säule verbliebene Pellet wurde in 100 µl OEB Puffer (70 °C) aufgelöst und zentrifugiert (1 min, 14000 rpm). Der letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt, indem der Durchfluss wieder auf 70 °C erhitzt wurde und erneut verwendet wurde. Das Produkt der Isolierung wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

### **2.2.6 Reverse Transkription der RNA**

Die reverse Transkription der RNA erfolgte unter Verwendung von „random hexamer“ Primern. Hierzu wurde 2 µg der Gesamt-RNA eingesetzt, die mit 1 µl Primer (20 pmol/µl) versetzt und anschließend auf 14 µl mit sterilem Wasser (RNase frei) aufgefüllt wurde. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Es erfolgte darauf die Zugabe von 4 µl 5x First Strand Buffer (Life Technologies GmbH) und 1 µl Desoxyribonukleotide (Stammlösung 20mM, dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Die Reaktion erfolgte mittels Zugabe von 1 µl Superskript Reverse Transkriptase (200 U/µl, Life Technologies GmbH) und wurde bei 42 °C für 60 min inkubiert. Um das Enzym zu denaturieren, wurde der Reaktionsansatz anschließend für weitere 10 min auf 70 °C erhitzt. Das entstandene Produkt wurde mit sterilem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C

gelagert. Eine Test-PCR auf Intaktheit dieser komplementären DNA (cDNA) wurde mit Aktin- oder EF1 $\alpha$ -Primern durchgeführt.

### **2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Zur Analyse der untranslatierten Exons wurde die Polymerase Kettenreaktion nach Mullis et al., 1987 (42) benutzt. Dabei wurden Puffer, Taq-Polymerasen und Desoxyribonukleotide der Firmen Amersham Pharmacia, Biotech und Qiagen verwendet.

Ein PCR-Ansatz enthielt 1  $\mu$ l cDNA (bis zu 100ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10mM), 3  $\mu$ l 10-fach Puffer, 22,5  $\mu$ l HPLC-Wasser, je 1  $\mu$ l Forward- und Reverseprimer (5pmol/ $\mu$ l) und 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l). Nach sorgfältiger Pipettierung der einzelnen Komponenten auf Eis wurde der Reaktionsansatz zunächst für 3 min auf 94  $^{\circ}$ C erhitzt. Anschließend wurde die cDNA in 40 Zyklen der Abfolge

- Denaturierung      1 min bei 94  $^{\circ}$ C
- Annealing            1 min bei 56  $^{\circ}$ C
- Elongation            1 min bei 72  $^{\circ}$ C

amplifiziert. Der letzte Schritt bestand in einer einmaligen terminalen Elongation für 5 min bei 72  $^{\circ}$ C. Nach Abschluss der Amplifikation verblieb das Produkt bis zur Aufbewahrung bei -20  $^{\circ}$ C bei 4  $^{\circ}$ C im Thermocycler. Die Annealingtemperatur wurde 4-8  $^{\circ}$ C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur gewählt. Die Primerkombinationen sind in Kapitel 3 aufgeführt.

Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde mit dem Produkt der PCR eine zweite (nested) PCR durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst das Produkt der ersten PCR mittels AutoSeq G50 $^{\circ}$  Säulen der Firma Amersham gereinigt. Nach Vortexen und Abzentrifugieren der Säulen für 3 min bei 6000 rpm, wurde das Produkt auf die Säulen aufgebracht. Die Reinigung erfolgte ebenfalls für 3 min bei 6000 rpm.

Der Reaktionsansatz der nested-PCR enthielt 1  $\mu$ l gereinigtes PCR Produkt der ersten PCR, 1  $\mu$ l dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10mM), 3  $\mu$ l 10-fach

Puffer, 22,5 µl HPLC-Wasser, je 1 µl Forward- und Reverseprimer (5pmol/µl) und 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl). Die Bedingungen im Thermocycler entsprachen denen der vorangegangenen PCR. Die Primerkombinationen sind im Kapitel 3 aufgeführt.

### **2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Visualisierung der in der PCR amplifizierten Exons erfolgte mittels Gelelektrophorese, bei der die DNA nach Größe und Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt wird.

Zur Herstellung des 1 % Agarosegels wurde 1 g Agarose mit 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer erhitzt und nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml) in Horizontal-Gelkammern gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde jeweils 10 µl PCR Produkt mit 1 µl loading dye gemischt, in die Taschen pipettiert und eine Spannung zwischen 110 V und 140 V angelegt. Zum Größenvergleich wurde ein 100 Bp-Marker verwendet. Die DNA wurde durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera fotografiert.

### **2.2.9 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde nach der dye terminator sequencing Methode, einer Weiterentwicklung der ursprünglichen Methode von Sanger et al. (43). Als Analysegerät stand ein ABI Sequenzer (ABI Prism 310) zur Verfügung.

Zunächst wurde das PCR Produkt mit AutoSeq® G50 Säulen der Firma Amersham gereinigt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 µl bis 6 µl gereinigtem nested-PCR Produkt, 8 µl Terminator Ready Reaction Mix (enthält fluoreszenzmarkierte Desoxyribonukleotide, sowie AmpliTaq DNA Polymerase) und 1 µl Sequenzierungsprimer (5 pmol/µl, s. Tab.1). Der Reaktionsansatz wurde nach sorgfältiger Pipettierung auf Eis mit sterilem HPLC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Sequenz PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma MJ

Research unter folgenden Bedingungen: einmalige Denaturierung bei 94 °C für 3 min, danach 25 Zyklen der Abfolge

- Denaturierung 30 s bei 94 °C
- Annealing 1 min bei 50 °C
- Elongation 1 min bei 60 °C

Als letzter Schritt erfolgte eine einmalige Elongationsphase bei 72 °C für 5 min. Nach Abschluss der Sequenz PCR verblieb das Produkt bei 4 °C im Thermocycler. Die endgültige Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -20 °C.

Die Proben wurden anschließend mit AutoSeq® G50 Säulen gereinigt. Dem gereinigten Produkt wurde 8,1 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,3), 220 µl Ethanol 100 % und 60 µl steriles HPLC-Wasser zugefügt und gründlich gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis, wurde die Probe bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet mit 400 µl Ethanol 70 % gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wurde der Überstand wiederum verworfen, das Pellet getrocknet und in 25 µl Template Suppression Reagent resuspendiert. Nach einer Denaturierungsphase von 3 min bei 94 °C wurde die Probe im Sequenzer analysiert.

### 3 Ergebnisse

Aufgrund der in Vorarbeiten (44) (45) entdeckten untranslatierten Exons des ERβ, wurden die Zelllinien primäre MSC, hFOB, SK-N-SH und T/C28a2 auf das Vorhandensein dieser Exons untersucht und deren vollständige cDNA-Sequenz ermittelt.

#### 3.1 Die genomische Organisation des ERβ

Zur Erstellung einer durchgehenden cDNA Sequenz dienten sich überlappende GenBank Einträge, die unter der Beachtung der GT/AG Regel abgeglichen wurden. Die nachfolgenden Einträge aus DDBJ, GenBank und EMBL dienten zur Erstellung der Sequenz:

AB006589, AB006590, AF215937, AF051427, AF051428, AF060555, AF061054, AF061055, AF074598, AF074599, AF191544, AF124790, AF215937,

AI917846, AI990922, AL161756, AL122035, AL352983, AL355094, AL359235, AQ184868, AX029400, AX022458, BF510841, BG722442, NM\_001437, X99101

(46) und AF051427, 175236, AF060555 (47).

Die daraus errechnete Sequenz besteht derzeit aus sieben untranslatierten Exons (0K,X1-X5,0N) und acht translatierten Exons (1-8), wobei das Exon 8 in fünf Varianten (8a-e) vorkommt (48) (Fig. 6). Die Nomenklatur der Sequenz wurde von Hirata, Shoda et al., 2003 übernommen.

Fig. 6: Durchgehende Sequenz des ERβ

1	cgagagggga cgctccctcc tcgtaggcgt ccacactgga gaaggaataa gatgggcgat	
61	tgctctggga gctgacagc gggggggcag ctgggatgct ggagaggact ggccccttga	
121	gttactgagt ccgatgaatg tgcttgctct gctggaggaa ccgcgctcag gttacagtca	<b>OK</b>
181	tcccaaatatg gttctgaaga catccaagtg gagatatggc atttaaattc atgagattgg	
241	atgagatccc accaaaggaa caggtttagg tggagacaac caaataccga tgcctaggac	
301	actgcagtgt ttagaattca aggagatgag aaggaaacag gagggaagat tgaaaagaag	<b>X<sub>1</sub></b>
361	agtccagtgt gttatgagga aaaccccaag agcatgctgc cttacaagac aggtgaaaaa	
421	tgtgttctgt gaaagaaaga gtaattaact gttaaatggt acagactgat caaataaaat	
481	gaagactgag aatggcctgt ttgtaagagg gagacatcaa cctggttggtg aaaagaatga	
541	tcacttaaag tccttagaaa ttctgaacca actctctagc aggtgatcct tgttagaatt	<b>X<sub>2</sub></b>
601	tgagccctta acgctatcca ggactggagg ttgaaggagc gatagaggga gcaggaggag	

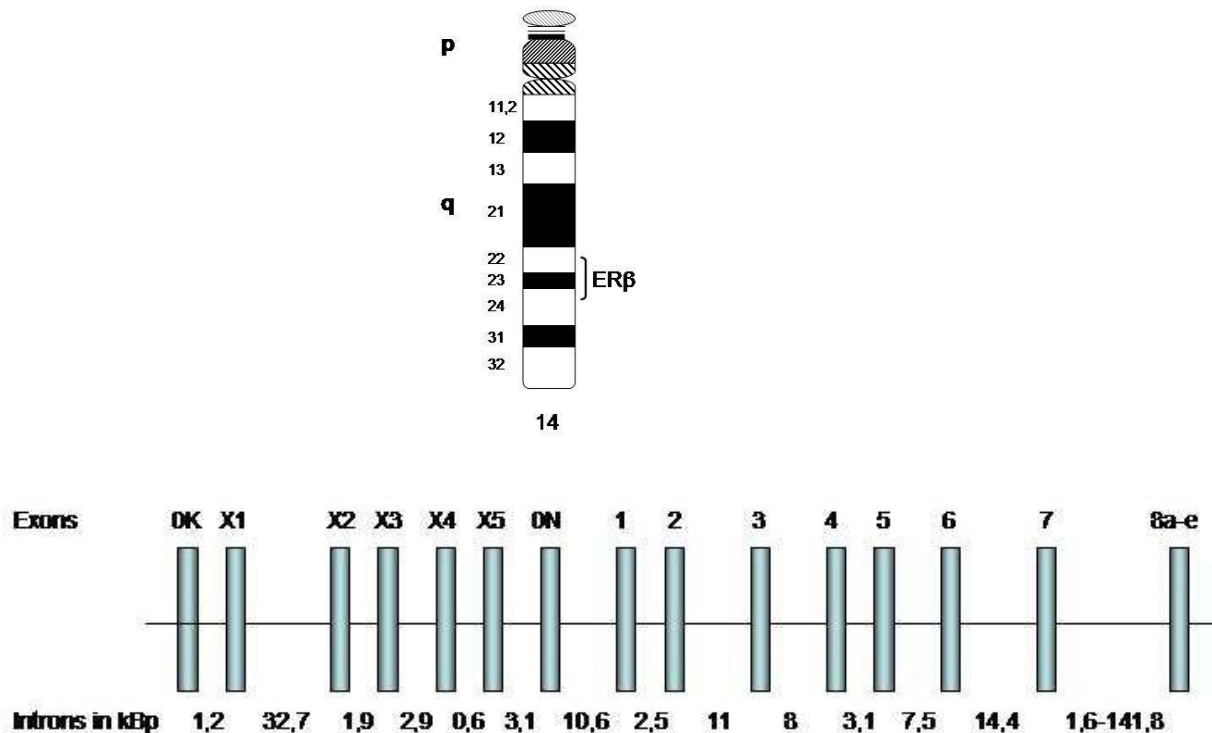
661	aatgcacatg	gattaaggag	cgagaacaca	gaaatcctgg	gctctcttct	cccagccaca	
721	aggttagggt	gaaaaacaga	gcagatggag	gtagtttgta	gcttacagggt	gccctgaatg	
781	aagcttccac	agtgtctaaag	tggaagaacg	agggactcca	aggggaaggat	tcaaggctgg	<b>X<sub>3</sub></b>
841	gcccatgac	ctgtgtaatt	cagaagagac	ccagaggag	atcagcgccc	tctaattagc	
901	cctgtatctg	ggctctacag	gacagacatg	cctccattta	tgcaacaaat	aagaacagca	<b>X<sub>4</sub></b>
961	tctcatgaca	gtggagaaaa	catgggatgt	gcaggtaggg	ttttgttttg	cctcttggtg	
1021	gtttctttcc	tacggaaaaat	tctccctctg	atctttccaa	gtcaaaggct	tcagcaaaaa	<b>X<sub>5</sub></b>
1081	tttgttgaac	gcgtggattg	tgtgctaggt	gggtgttatg	gaccatggag	aatgctagag	
1141	atgtaagaca	tgcgctgtcc	aatcgacg	caggttgtgt	tgacagctcg	gtctttaaaa	
1201	ggaagaagg	gcttatcgtt	aagtgccttg	tgatcttttc	agtttctcca	gctgctggct	
1261	ttttggacac	ccactcccc	gccaggaggc	agttgcaagc	gcggaggctg	cgagaaataa	
1321	ctgcctcttg	aaacttgacg	ggcaagagc	agcgggcgag	cgctgggccc	gggagggacc	<b>ON</b>
1381	acccgagctg	cgacgggctc	tggggctg	gggcagggct	ggcgcccggg	gcctgagctg	
1441	caggaggctg	gctcgctttc	ctcaacaggt	ggcgcgggg	cgcgcgccgg	gagaccccc	
1501	ctaagcggg	aaaagcacgt	gtccgcattt	tagagaaggc	aaggccggg	tgtttatctg	
1561	caagcatta	ttttgcca	cgaaatcttg	agaacattat	aatgaccttt	gtgcctcttc	
1621	ttgcaagggt	ttttctcagc	tgttatctca	agacatggat	ataaaaaact	cacctctag	
1681	ccttaattct	ccttctctct	acaactgcag	tcaatccatc	ttaccctgg	agcacggctc	
1741	catatacata	ccttctctct	atgtagacag	ccaccatgaa	tatccagcca	tgacattcta	
1801	tgccctctg	tgatgtaatt	acagcattcc	ccgaatgtc	actaacttgg	aagggtggcc	<b>1</b>
1861	tggtcggcag	accacaagcc	caaatgtgtt	gtggccaaca	cctgggcacc	tttctctttt	
1921	agtgtccat	cgccagttat	cacatctgta	tgcggaacct	caaaagagtc	cctggtgtga	
1981	agcaagatcg	ctagaacaca	ccttacctgt	aaacagagag	acactgaaa	ggaaggttag	
2041	tgggaacctg	tgcgccagcc	ctgttactgg	tccaggttca	aagagggatg	ctcactctg	<b>2</b>
2101	cgctgtctgc	agcgattacg	catcgggata	tactatgga	gtctggctcg	gtgaaggatg	
2161	taaggccttt	tttaaaagaa	gcattcaagg	acataatgat	tatatattgtc	cagctacaaa	<b>3</b>
2221	tcagtgtaca	atcgataaaa	accggcgcaa	gagctgccag	gcttgcggac	ttcggaagtg	
2281	ttacgaagtg	ggaatgggtg	agtgtggctc	ccggagagag	agatgtgggt	accgccttgt	
2341	gcgagacag	agaagtgcg	acgagcagct	gcaactgtcc	ggcaaggcca	agagaagtg	<b>4</b>
2401	cgccacgcg	ccccgagctg	gggagctgct	gctggacgcc	ctgagccccg	agcagctagt	
2461	gctcaccctc	ctggaggctg	agccgcccc	tgtgctgac	agccgcccc	gtgcccctt	
2521	accgagcc	tccatgatga	tgtccctgac	caagtggcc	gacaaggagt	tggtaacac	
2581	gatcagctgg	gccaagaaga	ttcccggtt	tgtggagctc	agcctgttcg	accaagtacg	<b>5</b>
2641	gctcttggag	agctgttggg	tggagggtgt	aatgatgggg	ctgatgtggc	gctcaattga	
2701	ccaccgccg	aagctcatct	ttgctccaga	tcttgttctg	gacagggatg	aggggaaatg	<b>6</b>
2761	cgtagaagg	attctgga	tctttgacat	gctcctggca	actacttcaa	ggtttcgaga	
2821	gttaaaactg	caacacaaag	aatatctctg	tgtcaaggcc	atgatcctgc	tcaattccag	<b>7</b>
2881	tatgtaccct	ctggtcacag	cgaccagga	tgtgacagc	agccggaagc	tggctcaact	
2941	gctgaacgcc	gtgaccgatg	ctttggtttg	ggtgattgcc	aagagcggca	tctcctccca	
3001	gcagcaatcc	atgcgctg	ctaacctcct	gatgctcctg	tcccacgtca	ggcatgagag	
3061	taacaaggcc	atggaacatc	ctgctcaaca	tgaagtgc	aaatgtggtc	ccagtgtatg	
3121	acctgctgct	ggagatgctg	aatgccacg	tgtctcggg	gtgcaagtc	tccatcacgg	<b>8a</b>
3181	ggtccgagtg	cagcccgga	gaggacagta	aaagcaaga	gggtcccag	aaccacagt	
3241	ctcagtgacg	cctggcctg	aggtgaactg	gccacagag	gtcacaagct	gaagcgtgaa	
3301	ctcca						
3001	gcagcaatcc	atgcgctg	ctaacctcct	gatgctcctg	tcccacgtca	ggcatgagag	
3061	ggcagaaaag	gcctctcaaa	cactcacctc	atttggaatg	aagatggaga	ctcttttggc	<b>8b</b>
3121	tgaagcaacg	atggagcagt	gacctctaa	tcaactcgtg	ggcctaaaga	aatcttggg	
3181	taa						
3001	gcagcaatcc	atgcgctg	ctaacctcct	gatgctcctg	tcccacgtca	ggcatgagag	
3061	ctctctctca	ctctcttggg	gattgtttat	gctgagggaa	gccagctgcc	atggtgtgag	<b>8c</b>
3121	gcagactcct	ggaggagccc	acatgtctgt	aagtagaagc	agatcttttg	aggcctgtca	
3181	acagccacgg	gaatgagctt	ggaagcagat	cccaacctcc	tccctcacac	aagtcgagcc	
3241	ttcag						
3001	gcagcaatcc	atgcgctg	ctaacctcct	gatgctcctg	tcccacgtca	ggcatgagag	
3061	atggggagaa	aagcaattca	ttcattcatt	tgaagttatc	ttagtgccaa	gagtcagtgtg	<b>8d</b>
3121	aaaatgtc						
3001	gcagcaatcc	atgcgctg	ctaacctcct	gatgctcctg	tcccacgtca	ggcatgagaa	
3061	ggtacgcgc	ctaaggagct	gctctgctgc	ttgggcttgg	gatgggatta	tgtgctccac	<b>8e</b>
3121	ggagggtg						

Dargestellt ist die durchgehende Sequenz des ER $\beta$  ohne Introns. Die einzelnen Exons sind farblich voneinander abgehoben. Enthalten sind die sieben bekannten untranslatierten Exons (OK, X1-X5, ON), die translatierten Exons (1-8), sowie die fünf Isoformen des Exons 8 (8a, 8b, 8c, 8d, 8e).



Das ER $\beta$  Gen ist auf Chromosom 14q 22-24 lokalisiert. Die einzelnen Exons sind durch Introns der Länge 0,6 kBp bis 141,8 kBp voneinander getrennt (Fig. 7). Die Gesamtlänge des Gens beträgt über 244 kBp.

Fig. 7: Lokalisation und Größe des ER $\beta$  Gens



Auf der oberen Abbildung ist die Lage des ER $\beta$  Gens auf dem Chromosom 14 verzeichnet (49). Die untere Abbildung zeigt schematisch die Länge der Introns in kBp , welche die Exons voneinander trennen (50).

## 3.2 Nachweis der Expression des ER $\beta$

### 3.2.1 Etablierung einer PCR zum Nachweis des ER $\beta$

Um die Expression von ER $\beta$ -mRNA untersuchen zu können, musste zunächst eine Primerkombination etabliert werden. Es wurde von allen Zelllinien polyA+ RNA isoliert und revers transkribiert. Der Erfolg der Transkription wurde mit einer Aktin-PCR getestet. Zur Überprüfung wurde vorerst nur die Zelllinie SK-

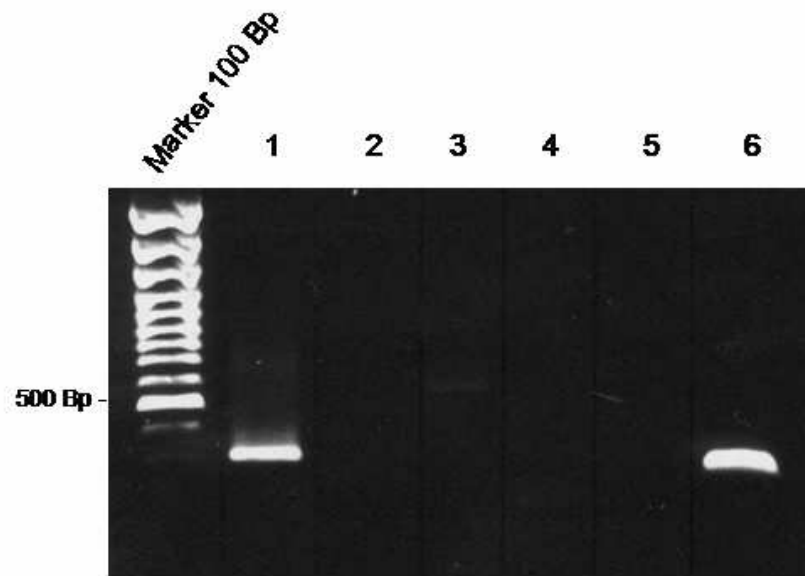
N-SH verwendet. Eine erste PCR mit den Primerkombinationen von Exon 1 und 2 der Tabelle 3 erbrachte nach Auftrennung im Agarosegel keine sichtbaren PCR Produkte. Aus diesem Grund wurde eine nested-PCR durchgeführt (Primer Tab. 3) und die Produkte wiederum im Agarosegel getrennt.

Tab. 3: Primerkombinationen zur PCR Etablierung der ER-Expression

Primerkombination	PCR1	nested-PCR	Produktlänge nested-PCR in Bp
1	Ex1for2 - Ex4rev1	Ex1for2 - Ex2rev2	298
2	Ex1for2 - Ex4rev1	Ex1for2 - Ex2rev1	270
3	Ex1for2 - Ex4rev1	Ex1for2 - Ex1rev2	140
4	Ex1for2 - Ex4rev1	Ex2for1 - Ex2rev2	103
5	Ex1for2 - Ex4rev1	Ex2for1 - Ex2rev1	75
6	Ex2for1 - Ex4rev1	Ex2for1 - Ex3rev1	255

Die anschließende Sequenzierung der Produkte 1 und 6 (Fig. 8) ergab für das nested-PCR Produkt 1 eine Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbankeintrag AB006590). Dabei hat das Produkt 1 die erwartete Länge von 298 Nukleotide. Für das Produkt 6 ergab sich keine Übereinstimmung. Die Primerkombination 1 wurde weiterhin als Positivkontrolle für die PCR und die Sequenzierung verwendet.

Fig. 8: Etablierung der PCR an SK-N-SH



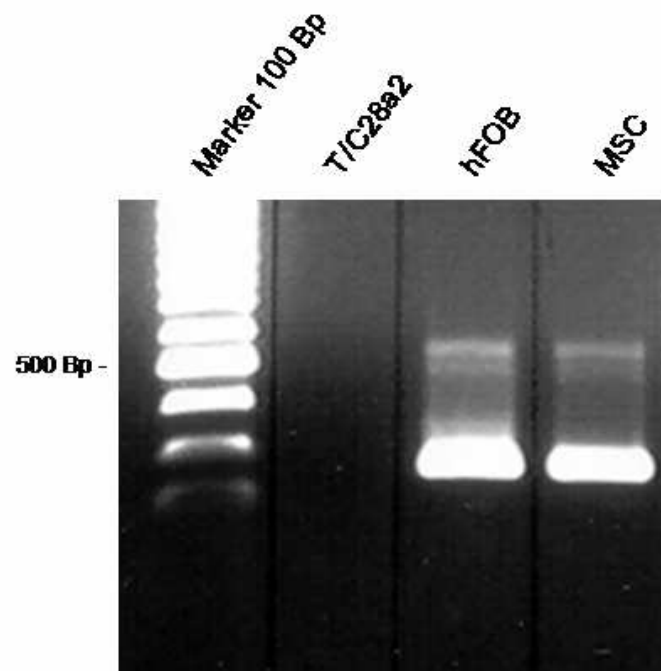
Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Überprüfung verschiedener Primerkombinationen an SK-N-SH. In diesem Gel wurden die Produkte der nested-PCR aufgetrennt. Die Sequenzierung der Produkte ergab eine positive Übereinstimmung mit dem Genom von ER $\beta$  für das Produkt 1.

### 3.2.2 Expression von ER $\beta$ in den Zelllinien

Die aus der polyA<sup>+</sup> RNA gewonnene cDNA der Zelllinien T/C28a2, hFOB und MSC wurde für die weitere Überprüfung der Expression von ER $\beta$  verwendet. Hierzu wurde ER $\beta$  mittels Primerkombination 1 (Tab. 3) amplifiziert und die nested-PCR Produkte im Agarosegel aufgetrennt (Fig. 9). Die Sequenzierung der Produkte aus den Zelllinien hFOB und MSC ergaben Übereinstimmungen für ER $\beta$  mit der publizierten Sequenz (Genbankeintrag AB006590). Für die Zelllinie T/C28a2 konnte kein PCR Produkt nachgewiesen werden. Um den negativen Befund der Zelllinie abzusichern, wurde zusätzlich eine totale RNA isoliert und revers transkribiert. Die anschließende Amplifikation mittels PCR

und der Primerkombination 1 (Tab. 3) zeigte nach Auftrennung im Agarosegel wiederum kein PCR Produkt.

Fig. 9: ER-Expression in verschiedenen Zellsystemen



Die Abbildung zeigt den Nachweis der Expression von ER $\beta$  in den Zellsystemen hFOB und mesenchymalen Stammzellen (MSC). Die Identität der Produkte der nested-PCR für die Zelllinien hFOB und MSC wurden durch Sequenzreaktionen bestätigt. Für T/C28a2 konnte kein Produkt nachgewiesen werden.

### 3.3 Nachweis der Expression untranslatierter Exons

#### 3.3.1 Etablierung einer PCR zum Nachweis von untranslatierten Exons im Zellsystem SK-N-SH

Um die mögliche Transkription der untranslatierten Exons des ER $\beta$  zu untersuchen, mussten zuerst die zugehörigen PCR Reaktionen durch

Kombination eines jeweilig Exon-spezifischen forward-Primer mit einem reverse-Primer aus dem Anfangsbereich des offenen Leserahmens etabliert werden. Hierzu wurde zuerst die polyA+ RNA verwendet. Nach reverser Transkription wurden die untranslatierten Exons mittels PCR und nested-PCR weiter amplifiziert. Der Erfolg der Transkription wurde mit einer Aktin-PCR getestet. Zur Amplifikation wurden die Primer der Tabelle 4 verwendet. Die nested-PCR Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt.

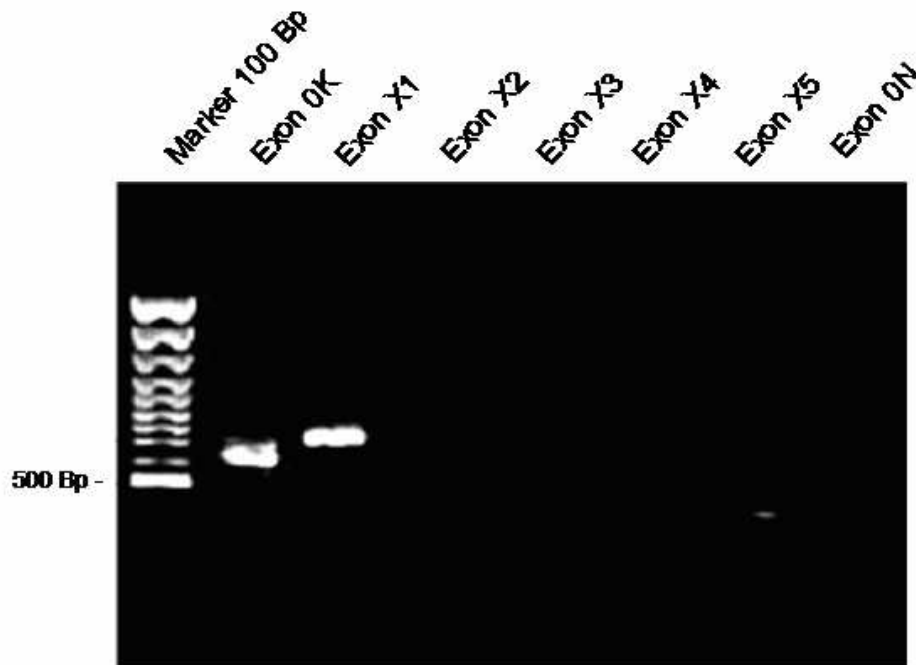
Tab. 4: Primerkombinationen zum Nachweis untranslatierter Exons

Exon	Primer PCR1	Primer nested-PCR	Produktlänge nested-PCR in Bp
0K	RTER $\beta$ 1/7F – Ex3rev1	Ex0Kfor1 – Ex2rev2	604
X1	Ex0X5for1 - Ex3rev1	ESRBE2BF – Ex2rev2	731
X2	RTER $\beta$ 3/7F - Ex3rev1	Ex0X4for1 – Ex2rev2	680
X3	RTER $\beta$ 4/7F - Ex3rev1	Ex0X3for1 – Ex2rev2	722
X4	RTER $\beta$ 5/7F - Ex3rev1	RTER $\beta$ 6/7F-Ex2rev2	581
X5	Ex0X1for1 - Ex3rev1	Ex0X1for2 – Ex2rev2	578
0N	Ex0Nfor2 - Ex3rev1	Ex0Nfor1 – Ex2rev2	589

Zur Bestätigung der Identität der PCR Produkte (Fig. 10) wurde die Sequenz der Amplifikate durch Sequenzreaktionen ermittelt. Es ergaben sich Übereinstimmungen für Exon 0K und für Exon X1 mit der publizierten Sequenz (Genbankeintrag AF051427). Die Größe der PCR Produkte entsprechen 604 Nukleotide für Exon 0K und 731 Nukleotide für Exon X1. Dies entspricht der vorher berechneten Länge, welche der durchgehenden genomischen Sequenz aus Figur 6 zu entnehmen war.

Für die anderen Primerkombinationen aus Tabelle 4 konnten keine spezifischen PCR Produkte nachgewiesen werden

Fig. 10: Untranslatierte Exons bei der Zelllinie SK-N-SH (polyA+ RNA)



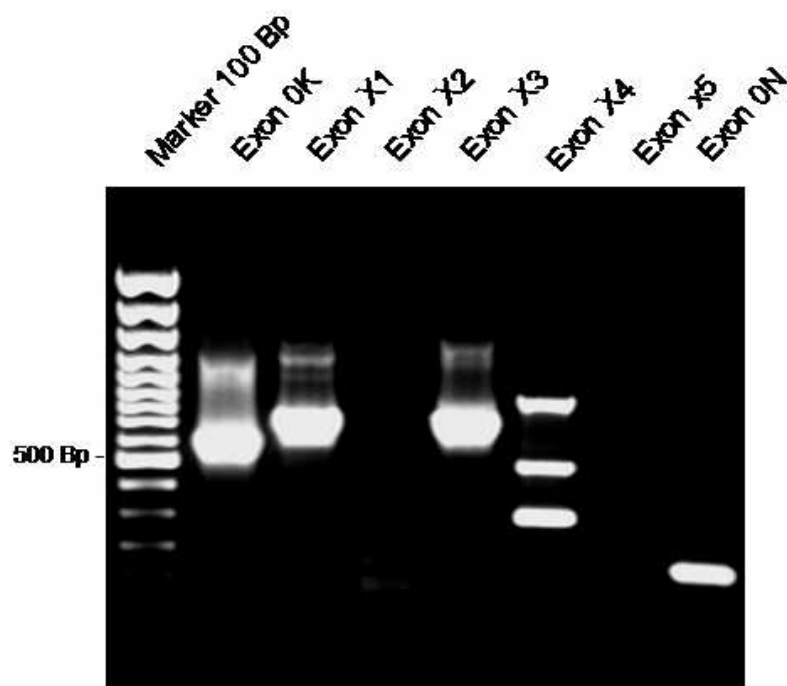
Die Abbildung zeigt die PCR Produkte der nested-PCR bei der Zelllinie SK-N-SH. Bei den Exons 0K und X1 sind Banden zu sehen, die der erwarteten Größe entsprechen. Die Identität der Produkte wurde durch Sequenzreaktionen bestätigt. Das Ausgangsmaterial war eine aus polyA+ RNA synthetisierte cDNA.

### 3.3.2 Weitere Untersuchungen des Zellsystems SK-N-SH auf untranslatierte Exons

Zur Bestätigung der Ergebnisse, die bei der Etablierung der PCR gewonnen wurden und um die negative Ergebnisse zu überprüfen, erfolgte die Isolierung und reverse Transkription zweier weiterer totaler RNAs. Die Amplifikation erfolgte durch PCR und nested-PCR mit den Primern der Tabelle 4. Die Auftrennung erfolgte im Agarosegel. Zusätzlich zu den bekannten untranslatierten Exons (vgl. Fig. 10) 0K und X1 ergaben sich PCR Produkte für die Exons X3, X4 und 0N (Fig. 11). Bei der Sequenzierung der Produkte von

beiden Seiten ergab sich eine Übereinstimmung für Exon X3 mit der publizierten Sequenz (Genbankeintrag AF051427). Für das Exon X4 und Exon 0N ergab sich keine Übereinstimmung. Die Größe des Produktes Exon X3 betrug 722 Nukleotide, was der erwarteten Größe entspricht (Fig. 6).

Fig. 11: Untranslatierte Exons der Zelllinie SK-N-SH (totale RNA)



Die Abbildung zeigt zusätzlich zu den aus Kap.3.3.1 bekannten Exons 0K und X1 PCR Produkte für die Exons X3, X4 und 0N. Davon konnte das Produkt für X3 positiv sequenziert werden. Grundlage war eine totale RNA.

### 3.3.3 Kontroll-PCR für bisher nicht nachweisbare untranslatierte Exons

In den vorangegangenen und folgenden Experimenten konnten die untranslatierten Exons X2, X4 und X5 bei keiner der verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass der negative Befund nicht durch fehlerhafte Primer verursacht worden war, wurden die

Primerkombinationen für die Exons X2, X4 und X5 aus Tabelle 4 gegen die der Tabelle 5 ausgetauscht. Die Primer wurden anhand der durchgehenden Sequenz (Fig. 6) ausgewählt.

Tab. 5: Primerkombinationen für bisher nicht nachweisbare Exons

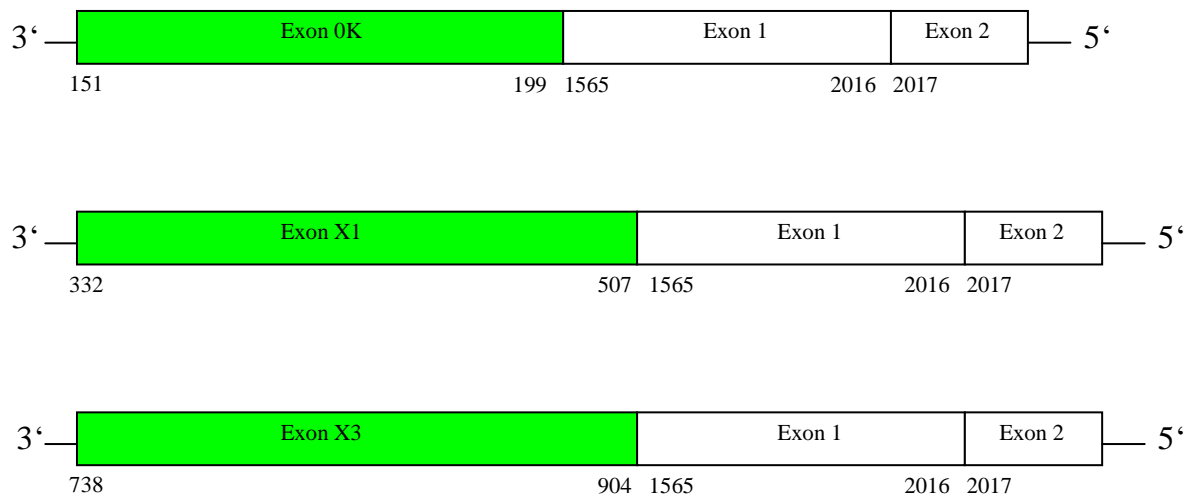
Exon	PCR1	nested-PCR	Produktlänge nested-PCR in Bp
X2	2Ex0X4for1 – Ex3rev1	2Ex0X4for2 – Ex2rev2	582
X4	RTER $\beta$ 5/7F - Ex3rev1	RTER $\beta$ 5/7F - Ex2rev2	634
	2Ex0X2for1 - Ex3rev1	2Ex0X2for2 – Ex2rev2	585
X5	2Ex0X1for1 – Ex3rev1	2Ex0X1for2 – Ex2rev2	575

Das Experiment wurde im Folgenden mit cDNA von allen Zellsystemen wiederholt. Bei der Durchführung mit cDNA der Zelllinie SK-N-SH konnten nach Auftrennung im Agarosegel wiederum keine weiteren PCR Produkte nachgewiesen werden.

Die in den Kapitel 3.3.1-3 bei der Zelllinie SK-N-SH gewonnenen Ergebnisse, bei denen die Exons 0K, X1 und X3 nachgewiesen wurden, konnten somit bestätigt werden. Durch die Sequenzierung der PCR Produkte wurde deren Länge, sowie die Übergänge zwischen den Exons bestimmt, was in Figur 12 dargestellt ist.



Fig. 12: Nachgewiesene Exons bei SK-N-SH



Die Darstellung zeigt schematisch die nachgewiesenen PCR Produkte bei SK-N-SH Zellen. Die Übergänge zwischen den Exons sind anhand der durchgehenden genomischen Sequenz (Fig. 6) bezeichnet.

### 3.3.4 Untersuchung von hFOB auf untranslatierte Exons

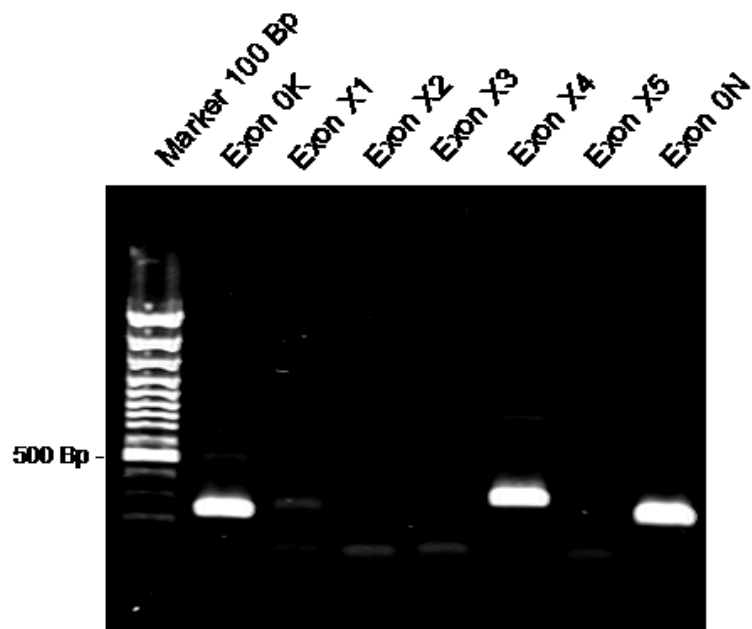
Zur Untersuchung der untranslatierten Exons in den Osteoblasten, wurde eine polyA<sup>+</sup> RNA der Zelllinie hFOB isoliert und revers transkribiert. Der Erfolg der Transkription wurde mit einer Aktin-PCR getestet. Die Amplifikation durch PCR und nested-PCR erfolgte mit den Primern der Tabelle 4. Nach der Auftrennung der nested-PCR im Agarosegel waren keine PCR Produkte nachweisbar.

Es wurden daraufhin drei weitere totale RNAs isoliert und revers transkribiert. Die anschließende PCR und nested-PCR erfolgte mit den Primern der Tabelle 4. Die Auftrennung erfolgte im Agarosegel. Bei einer cDNA konnten drei PCR Produkte nachgewiesen werden (Abbildung 13). Die Sequenzierung der PCR Produkte zum Nachweis von Exon 0K, Exon X4 und Exon 0N von beiden Seiten ergaben Übereinstimmungen für Exon 0K und für Exon 0N mit der publizierten Sequenz (Genbankeintrag AF051427). Für Exon X4 ergab sich keine Übereinstimmung.

Die Größe des Produktes Exon 0K betrug 245 Nukleotide, was 359 Nukleotide kürzer ist als die erwartete Länge von 604 Nukleotiden. Für das Produkt Exon 0N ergab sich eine Länge von 230 Nukleotiden, 359 Nukleotide kürzer als die

erwartete Länge von 589 Nukleotiden. Weitere Sequenzierungen ergaben, dass bei beiden Produkten die Sequenz für Exon 1 zwischen den Basen 1565 und 1922 (vgl. Fig. 6) fehlt. Es sind nur 93 der 452 Nukleotide von Exon 1 in den Produkten enthalten (Fig. 15).

Fig. 13: Untranslatierte Exons bei hFOB mit Deletion Exon 1

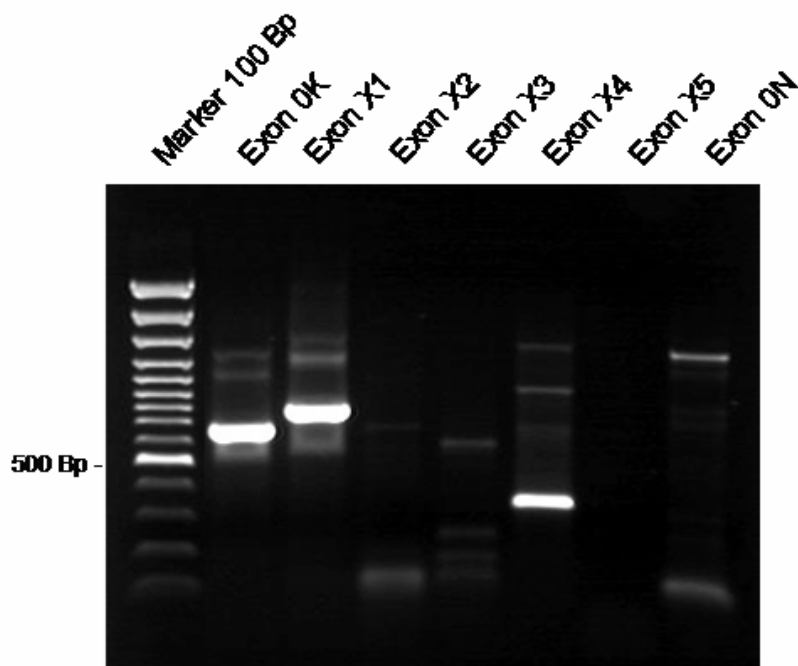


Die Abbildung zeigt Produkte der nested-PCR für die Exons 0K, X4 und 0N. Die Produkte sind kleiner als die erwartete Größe von ca. 600 Bp. Die Sequenzierung von 0K und 0N zeigte eine Deletion von Teilen des Exon 1. Die Identität von Exon X4 konnte nicht bestätigt werden.

Bei zwei weiteren cDNAs konnten nach der Auftrennung im Agarosegel PCR Produkte für Exon 0K, Exon X1 und Exon X4 nachgewiesen werden (Fig. 14). Die Sequenzierung von beiden Seiten ergab eine Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz bei Exon 0K (Genbankeintrag AF051427) und Exon X1 (Genbankeintrag BC024181). Die Länge der Produkte entsprechen mit 604 Nukleotiden bei Exon 0K und 731 Nukleotiden bei Exon X1 den mit der

durchgehenden Sequenz (vgl. Fig. 6) ermittelten Längen (Fig. 16). Für Exon X4 ergab sich keine Übereinstimmung.

Fig. 14: Untranslatierte Exons bei hFOB ohne Deletion Exon 1



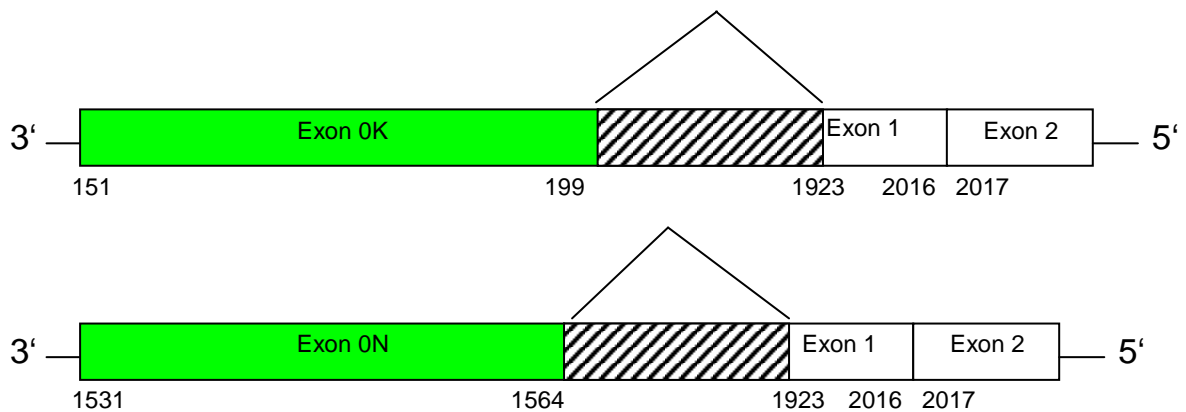
Die Abbildung zeigt die Produkte der nested-PCR für Exon 0K, X1 und X4. Die Sequenzierung war positiv für die Produkte 0K und X1. Die Produkte entsprachen der erwarteten Größe und konnten in zwei cDNAs nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle der Exons, bei denen bislang keine PCR Produkte nachweisbar waren, wurden die Primerkombinationen aus Tabelle 4 gegen die der Tabelle 5 ausgetauscht. Nach Auftrennung im Agarosegel konnten wiederum keine weiteren PCR Produkte nachgewiesen werden.

Die durchgeführten Versuche haben in der Zelllinie hFOB die untranslatierten Exons 0K, X1 und 0N nachgewiesen. Die Exons 0K und X1 wurden jeweils in zwei, das Exon 0N in einem von drei Experimenten positiv sequenziert. In einem Fall konnte eine Deletion von Teilen des Exons 1 nachgewiesen werden.

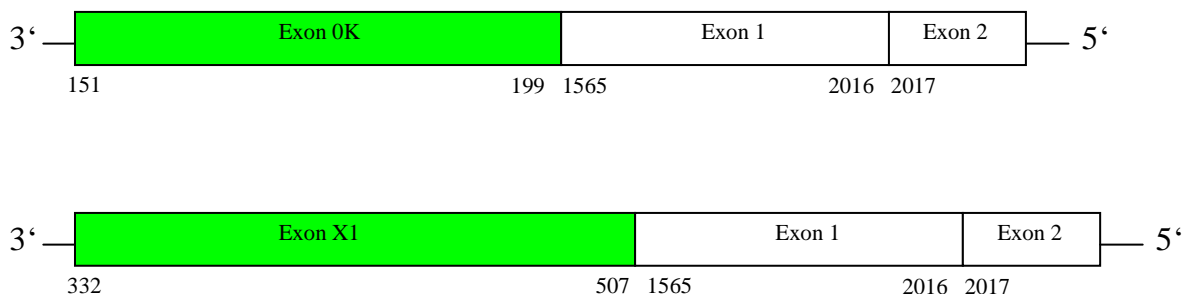
Die Figuren 15 und 16 zeigen eine schematische Darstellung der nachgewiesenen Exons.

Fig.: 15: Nachgewiesene Exons 0K und 0N mit Deletion Exon 1



Die schematische Darstellung der in einem Experiment nachgewiesenen PCR Produkte Exon 0K und 0N zeigt eine Deletion (schraffierte Fläche) von Teilen des Exons 1. Die Übergänge zwischen den Exons sind anhand der durchgehenden genomischen Sequenz (Fig. 6) bezeichnet.

Fig. 16: Nachgewiesene Exons 0K und X1 ohne Deletion Exon 1



Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der PCR Produkte. Die Übergänge zwischen den Exons sind anhand der durchgehenden genomischen Sequenz (Fig. 6) bezeichnet.

### 3.3.5 Untersuchung von primären MSC auf die Expression untranslatierter Exons

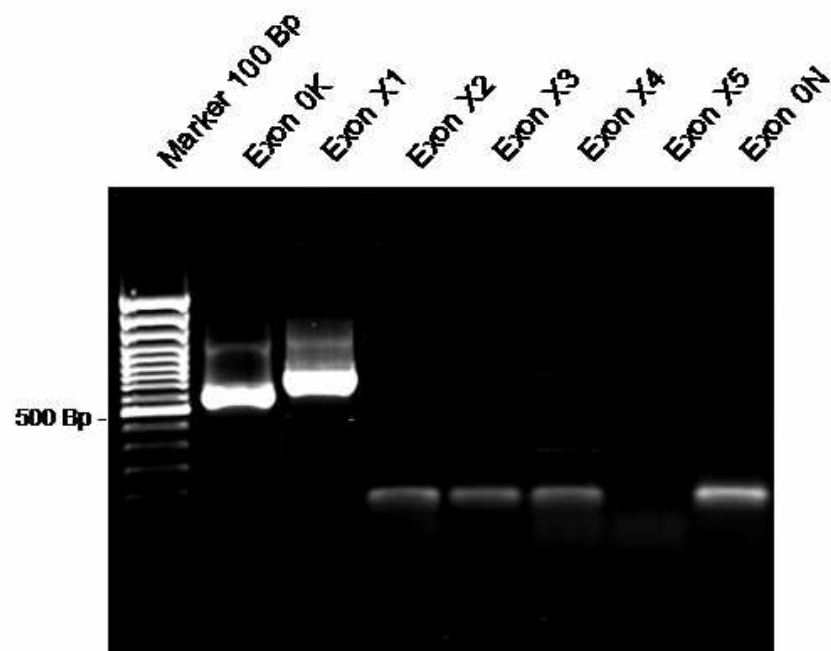
Um die mögliche Expression der untranslatierten Exons in MSC untersuchen zu können, wurde eine polyA+ RNA isoliert und revers transkribiert. Der Erfolg der Transkription wurde mit einer Aktin-PCR getestet. Die anschließende PCR und

nested-PCR wurde mit den Primern der Tabelle 4 durchgeführt. Nach Auftrennung im Agarosegel waren keine PCR Produkte nachweisbar. Daraufhin wurden fünf weitere totale RNAs aus verschiedenen Zellkulturen isoliert und revers transkribiert (im Folgendem MSC1 bis MSC5 genannt).

Nach Auftrennung im Agarosegel waren PCR Produkte für Exon 0K, X1, X4 und 0N nachweisbar. Stellvertretend sind in der Figur 17 die positiv sequenzierten PCR Produkte Exon 0K und Exon X1 abgebildet.

Tabelle 6 zeigt die Verteilung der in den einzelnen cDNA nachgewiesenen untranslatierten Exons.

Fig. 17: Untranslatierte Exons bei MSC (cDNA MSC5)



Die Abbildung zeigt stellvertretend für alle Experimente mit MSC die nested-PCR Produkte von MSC5. Die Identität der Exons 0K und X1 konnte durch Sequenzreaktionen bestätigt werden.

Tab. 6: nachgewiesene untranslatierte Exons in MSC1-5

cDNA	Exon 0K	Exon X1
MSC1	+	-
MSC2	-	-
MSC3	+	-
MSC4	-	+
MSC5	+	+

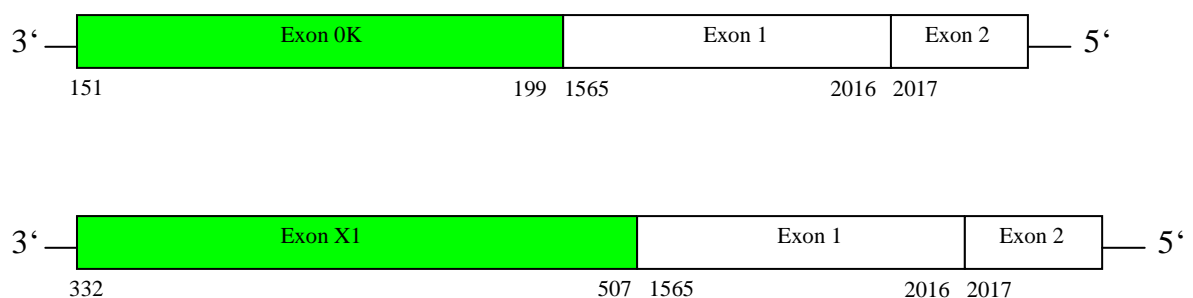
Die PCR Produkte wurden von beiden Seiten sequenziert. Dabei ergaben sich positive Übereinstimmungen mit den publizierten Sequenzen für Exon 0K (Genbankeintrag AF051427) und Exon X1 (Genbankeintrag BC024181). Die Länge der Produkte entsprach mit 604 Nukleotiden bei Exon 0K und 731 Nukleotiden bei Exon X1 den mit der durchgehenden Sequenz (Fig. 6) ermittelten Längen.

Für das Exon X4 konnte keine Übereinstimmung festgestellt werden.

Zur Kontrolle der Exons, bei denen bislang keine PCR Produkte nachweisbar waren, wurden die Primerkombinationen aus Tabelle 4 gegen die der Tabelle 5 ausgetauscht. Nach Auftrennung im Agarosegel konnten wiederum keine weiteren PCR Produkte nachgewiesen werden.

In Figur 18 sind die in MSC nachgewiesenen untranslatierten Exons in einer schematischen Darstellung abgebildet.

Fig. 18: Nachgewiesene Exons 0K und X1 bei MSC



Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der PCR Produkte von MSC. Die Übergänge zwischen den Exons sind anhand der durchgehenden genomischen Sequenz (vgl. Fig.6) bezeichnet.

### **3.3.6 Untersuchung von T/C28a2 auf die Expression untranslatierter Exons**

Mit der zuvor synthetisierten cDNA aus polyA+ RNA (vgl. Kap. 3.2.2) wurde eine PCR und eine nested-PCR durchgeführt. Zur Amplifikation der Produkte dienten die Primer der Tabellen 4 und 5. Nach der Auftrennung im Agarosegel konnten keine PCR Produkte nachgewiesen werden.

Zur weiteren Untersuchung wurde eine totale RNA aus einer anderen Zellkultur isoliert und revers transkribiert. Der Erfolg der Transkription wurde mit einer Aktin-PCR getestet. Die PCR und nested-PCR wurden mit Primern der Tabellen 4 und 5 durchgeführt. Nach Auftrennung im Agarosegel konnte für das Exon X5 (Primer Tab. 5) ein PCR Produkt nachgewiesen werden. Die Sequenzierung von beiden Seiten ergab keine Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz.

## **3.4 Expression von ER $\beta$ während der Differenzierung von MSC**

### **3.4.1 Osteogene Differenzierung**

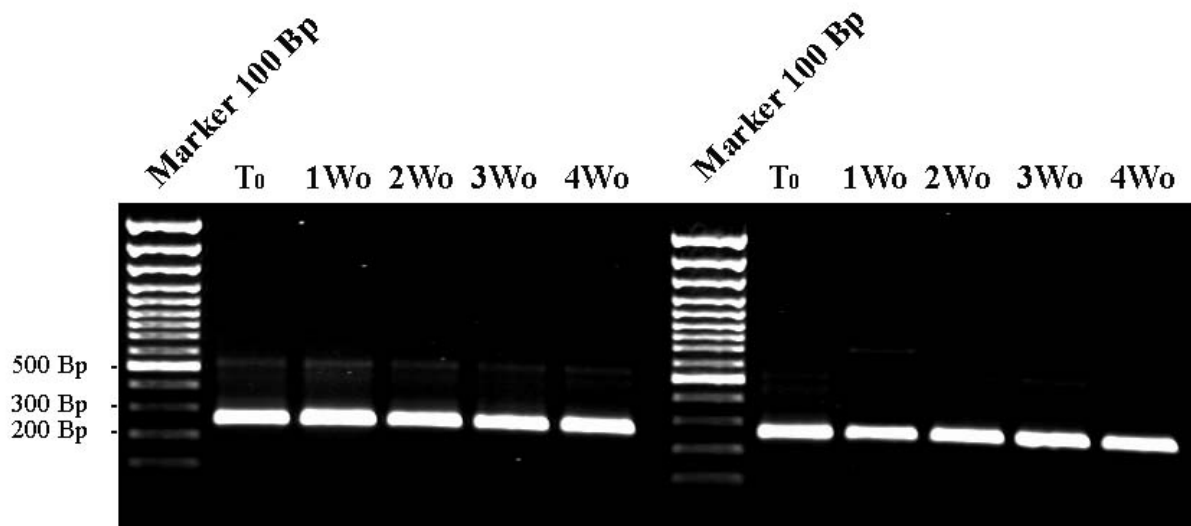
Bei einer Zellkultur MSC wurde nach oben beschriebener Methode (vgl. Kap. 2.2.2) die osteogene Differenzierung induziert. Zum Zeitpunkt T0, nach einer Woche, nach zwei Wochen, nach drei Wochen und nach vier Wochen wurde jeweils eine totale RNA aus den stimulierten Zellen isoliert und revers transkribiert. Mit einer zweiten Zellkultur wurde gleichermaßen verfahren. Der Erfolg der Transkription wurde mit einer PCR für Aktin überprüft. Die anschließende Amplifikation mittels PCR bzw. nested-PCR wurde mit den Primern der Tabelle 7 durchgeführt. Die Anzahl der durchlaufenen nested-PCR Zyklen wurde auf 20 reduziert.

Tab. 7: Primerkombinationen für den Nachweis von ER $\beta$

PCR1	nested-PCR	Produktlänge nested-PCR in Bp
Ex2for1 – Ex4rev1	Ex2for1 – Ex3rev1	255

Nach der Auftrennung im Agarosegel konnte für alle Stadien der Stimulation ein PCR Produkt nachgewiesen werden (Fig. 19). Ein quantitativer Unterschied konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden.

Fig. 19: PCR Produkte MSC nach osteogener Differenzierung



Die Abbildung zeigt in allen Stadien der osteogenen Differenzierung PCR Produkte. Ein quantitativer Unterschied in der Intensität der einzelnen Banden ist nicht zu erkennen.

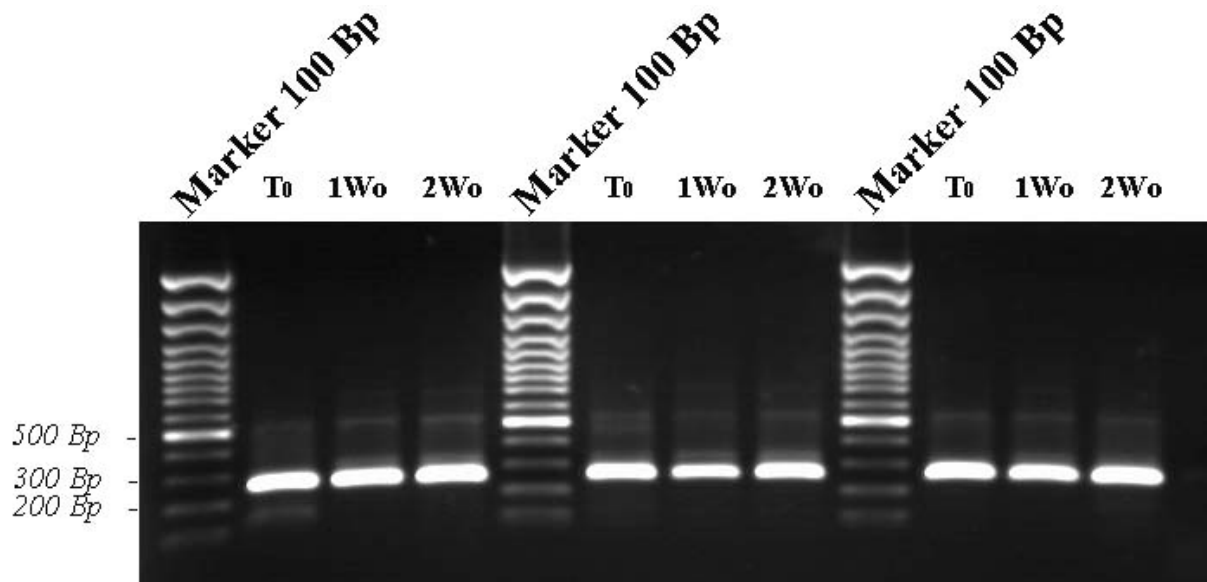
### 3.4.2 Adipogene Differenzierung

Es wurde bei drei verschiedenen Zellkulturen von MSC eine adipogene Stimulation induziert (vgl. Kap. 2.2.2). Zu den Zeitpunkten T<sub>0</sub>, nach einer Woche und nach zwei Wochen wurde jeweils eine totale RNA isoliert und revers transkribiert. Der Erfolg der Transkription wurde mit einer PCR für Aktin überprüft. Für die PCR und nested-PCR wurden die Primer der Tabelle 7 verwendet. Nach Auftrennung im Agarosegel konnten in allen Stadien der



Differenzierung PCR Produkte nachgewiesen werden (Fig. 20). Ein quantitativer Unterschied konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden.

Fig. 20: PCR Produkte MSC nach adipogener Differenzierung



Die Abbildung zeigt in allen Stadien der adipogenen Differenzierung PCR Produkte. Ein quantitativer Unterschied in der Intensität der einzelnen Banden ist nicht zu erkennen.

# 4 Diskussion

## 4.1 Methodische Überlegungen

Östrogenrezeptoren (ER) sind an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse wie z.B. Knochenstoffwechsel, Reproduktion, Entstehung von malignen Erkrankungen und vielen mehr beteiligt. Der Einfluss auf eine solche Vielfalt von Prozessen wird begünstigt durch eine entsprechend komplexe Organisation des Genoms der ER, welche durch die zahlreichen unterschiedlich gespleissten und transkribierten Exons gegeben ist. Nach der Entdeckung des ER $\beta$  1996 (3) waren lange Zeit nur die Exons 1-8 des ER $\beta$  Gens bekannt. Erst im Jahr 2000 gelang der Nachweis des untranslatierten Exon ON (28). Zusätzlich zu den bisher bekannten acht translatierten Exons (35) wurden bisher sieben weitere, untranslatierte Exons nachgewiesen (37). Die untranslatierten Exons besitzen eigene Promotorregionen für die Expression des ER $\beta$ . Über deren gewebespezifische Nutzung existieren zurzeit nur unvollständige Angaben. Diese Arbeit befasst sich mit der gewebespezifischen Expression der untranslatierten Exons in mesenchymalen Stammzellen (MSC), humanen fetalen Osteoblasten (hFOB), Neuroblastomzellen (SK-N-SH) und Chondrozyten (T/C28a2), sowie der Expression von ER $\beta$  während der osteogenen und adipogenen Differenzierung von MSC.

Für die Untersuchungen wurden zwei Methoden verwendet: die Amplifikation von DNA mittels PCR und die Sequenzierung der PCR Produkte. Auf PCR Amplifikation basierende Untersuchungen zeichnen sich in der Regel durch eine hohe Sensitivität aus. Theoretisch wird nur ein DNA-Molekül für eine erfolgreiche PCR benötigt. In der Praxis wird diese Sensitivität jedoch selten erreicht. Inhibitorische Substanzen, Verdünnungseffekte oder der Verlust von RNA oder DNA während der Extraktionsprozesse können zu falsch negativen Ergebnissen führen. Eine der ersten PCR nachgeschaltete zweite PCR ist in der Lage, die Sensitivität um den Faktor 10000 (51) zu erhöhen. Dadurch wird

aber auch die Anzahl der einzelnen Schritte der Prozessierung erhöht und damit die Anzahl möglicher Fehlerquellen, die auch zu falsch positiven Signalen führen können.

Eine typische Zelle enthält ca. 10-30 pg RNA. Der Grossteil davon ist tRNA und rRNA. Der Anteil an mRNA ist mit durchschnittlich 1-5% vergleichsweise gering. Die mRNA in eukaryoten Zellen wird nach der Transkription mit 20-250 Adenosinnukleotiden versehen. Diese Polyadenylierung kann man nutzen, um den Anteil an unerwünschter tRNA und rRNA zu reduzieren. Aus diesem Grund wurde zunächst aus allen Zelllinien die polyadenylierte RNA (polyA+ RNA) isoliert und daraus eine cDNA synthetisiert. Durch die Isolierung können natürlich auch RNA-Moleküle verloren gehen, bzw. werden noch nicht polyadenylierte Moleküle erst gar nicht erfasst. Dies kann zu falsch negativen Ergebnissen führen, die durch den Einsatz einer totalen RNA nicht entstanden wären.

## **4.2 Nachweis des ER $\beta$**

Für die Überprüfung der Zelllinien auf das Vorhandensein von ER $\beta$  wurden ausschließlich Primer verwendet, die innerhalb der bekannten, translatierten Exons liegen und aus der Literatur bei anderen Zellsystemen bekannt sind. Erwartungsgemäß konnte für SK-N-SH, hFOB und MSC der ER $\beta$  nachgewiesen werden. Die PCR Produkte entsprachen der erwarteten Länge und die Identität konnte durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden. Diese entsprach den in den Literaturdatenbanken publizierten Ergebnissen (52) (53) (54).

Bei Chondrozyten der Zelllinie T/C28a2 konnte kein ER $\beta$  nachgewiesen werden. Durch eine Aktin-PCR wurde die Funktionstüchtigkeit der cDNA positiv bestätigt. Bei den Primern handelt es sich um dieselben, mit denen auch die anderen Zelllinien getestet wurden. Eine fehlerhafte cDNA und defekte Primer konnten damit mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache der divergenten Ergebnisse ausgeschlossen werden. Da möglicherweise die Konzentration von ER $\beta$  mRNA zu gering war, wurde eine totale RNA isoliert. Die synthetisierte

cDNA wurde mittels Aktin-PCR positiv getestet. Auch hier ließ sich kein ER $\beta$  nachweisen. Als mögliche Ursache kommt zum einen eine zu geringe ER $\beta$  RNA Konzentration in den Chondrozyten in Frage. Im Extremfall kann eine Zelle nur wenige Moleküle der gesuchten mRNA enthalten. Obwohl in diesem Fall die Sensitivität der PCR durch eine nested-PCR bereits erhöht wurde, kann die Ausgangskonzentration an RNA immer noch zu niedrig sein, so dass sie von der PCR nicht erfasst wird. Es besteht des Weiteren die Möglichkeit, dass in T/C28a2 kein ER $\beta$  exprimiert wird. In der Literatur wurden bisher nur Knorpelbiopsien untersucht und ER $\beta$  in diesen nachgewiesen (55). An Zellkulturen wie T/C28a2 fanden bisher noch keine Untersuchungen bezüglich des ER $\beta$  statt.

### **4.3 Nachweis untranslatierter Exons des ER $\beta$**

#### **4.3.1 SK-N-SH**

Aufgrund des positiven Nachweises von Er $\beta$  in der mittels polyA+ RNA gewonnenen cDNA, wurde diese auch weiterhin für die Untersuchung der untranslatierten Exons verwendet. Dabei kommen sowohl aus der Literatur bekannte Primer zum Einsatz, als auch neue, die anhand der durchgehenden Sequenz in Figur 6 ausgesucht wurden. Da auch hier in einer ersten PCR kein Produkt nachweisbar war, musste die Sensitivität durch eine nested-PCR erhöht werden. In dieser nested-PCR konnten nach der Sequenzierung die bisher bei SK-N-SH unbekannt untranslatierten Exons 0K und X1 nachgewiesen werden. Zur Bestätigung und Nachvollziehbarkeit des Ergebnisses wurden zwei weitere totale RNAs isoliert und in der Folge konnte die Nutzung von Exon 0K und X1 in SK-N-SH in beiden Fällen bestätigt werden. Zusätzlich konnte in beiden cDNAs das Exon X3 nach nested-PCR und Sequenzierung nachgewiesen werden. Durch die Sequenzanalyse der PCR Produkte konnte gezeigt werden, dass die Übergänge zwischen den untranslatierten Exons und dem ersten translatierten Exon 1 exakt der Sequenz aus Figur 6 entsprechen, wie es aus der Literatur bekannt ist (44).

Weitere PCR Produkte konnten durch Sequenzierung nicht einem untranslatierten Exon zugeordnet werden. Das Auftreten dieser Produkte kann auf Homologien zwischen Primern und tRNA oder rRNA zurückgeführt werden, da sie nur in der totalen RNA zu finden waren, nicht aber in der durch Isolierung gereinigten mRNA. In keinem Experiment dieser Arbeit konnte das Vorkommen der Exons X2, X4 und X5 nachgewiesen werden. Um die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens defekter Primer als Ursache zu minimieren, wurden zusätzliche Primer für diese Exons anhand von Figur 6 ausgesucht und verwendet. Auch hier ergaben sich keine weiteren PCR Produkte für die Zelllinie SK-N-SH.

Durch den Nachweis von Exon X3 in den beiden totalen RNAs und die Verwendung einer nested-PCR ist anzunehmen, dass auch hier die Sensitivität der PCR limitiert sein kann. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere untranslatierte Exons vorliegen, die mangels sensitiver Analysetechnik unterhalb der Nachweisgrenze liegen und nicht nachgewiesen werden konnten. Die Fehlerquellen wurden durch Verwendung unterschiedlicher RNA/cDNA und mehrerer Primerkombinationen auf ein Minimum beschränkt, so dass abschließend davon ausgegangen werden kann, dass in der Zelllinie SK-N-SH die untranslatierten Exons X0, X1 und X3 und somit deren Promotorregionen für die Expression von ER $\beta$  genutzt werden.

#### **4.3.2 hFOB**

Auch bei der Zelllinie hFOB wurde zunächst die aus der polyA<sup>+</sup> RNA synthetisierte cDNA für die Untersuchung auf die Expression untranslatierter Exons verwendet. Die Funktionstüchtigkeit der cDNA wurde anhand einer Aktin-PCR und dem positiven Nachweis von ER $\beta$  in dieser cDNA festgestellt. Nach einer nested-PCR konnten keine Produkte im Agarosegel nachgewiesen werden. Da aus den vorangegangenen Experimenten schon der Verdacht bestand, dass die Konzentration an mRNA für einen Nachweis einzelner untranslatierter Exons zu gering ist, wurden drei weitere totale RNAs isoliert und revers transkribiert. In zwei dieser cDNAs konnten die untranslatierten Exons 0K und X1 nachgewiesen werden. Das Exon 0N wurde nur in einer cDNA

gefunden. Die durch Sequenzierung analysierten Produkte entsprachen in zwei Fällen der nach Figur 6 erwarteten Größe. Die Übergänge zwischen den untranslatierten Exons und dem ersten translatierten Exon konnten wie erwartet bestätigt werden und entsprachen den Angaben der Literatur (44).

Bei der Auftrennung im Agarosegel war auffällig, dass die Produkte einer cDNA nicht der erwarteten Größe entsprachen. Die Produkte waren ca. 350 Nukleotide kürzer als erwartet. Die Sequenzanalyse der PCR Produkte aus dieser cDNA ergab Abweichungen zu der erwarteten Sequenz. Anstatt mit dem Anfang des ersten translatierten Exons an Base 1565 verknüpft zu sein, fehlten 359 Nukleotide des Exons 1. Die Sequenzierung bestätigte das Ergebnis der Gelelektrophorese. Die untranslatierten Exons 0K und 0N waren mit dem Nukleotid an Base 1923 (vgl. Fig. 6) verbunden. Es scheint sich hierbei um eine zusätzliche Splicevariante zu den vielen aus der Literatur bekannten Splicevarianten des ER $\beta$  zu handeln (56). Für die Zelllinie hFOB war diese Variante bisher unbekannt.

Die Variabilität im Nachweis der untranslatierten Exons spricht auch bei dieser Zelllinie für eine sehr geringe Konzentration der ER $\beta$  mRNA. Fehlerquellen wurden durch die Verwendung verschiedener RNAs, sowie unterschiedlicher Primerkombinationen auf ein Minimum reduziert. In dieser Arbeit konnte die Expression von Exon 0K, X1 und 0N erstmalig nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine neue Splicevariante des Exons 1 nachgewiesen werden.

#### **4.3.3 MSC**

Die Untersuchung der Zelllinie MSC wurde aufgrund des positiven Nachweises von ER $\beta$  in der polyA+ RNA an der aus dieser RNA gewonnen cDNA durchgeführt. Wie in allen Experimenten wurde nach einer PCR eine zusätzliche nested-PCR durchgeführt. Die Auftrennung im Agarosegel konnte keine PCR Produkte nachweisen. Da dieses Problem schon aus vorangegangenen Experimenten bekannt war, wurde aus fünf weiteren Zellkulturen totale RNA isoliert und revers transkribiert. In allen cDNAs außer

einer konnten untranslatierte Exons mit unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen werden.

In der Gelelektrophorese waren PCR Produkte des Exon 0K in insgesamt drei verschiedenen cDNAs sichtbar. Die folgende Sequenzierung konnte die erwartete Größe der PCR Produkte von 604 Nukleotiden bestätigen und der Datenbankabgleich ergab eine Übereinstimmung mit der bekannten Sequenz des ER $\beta$ . Auch die Übergänge zwischen dem untranslatierten Exon und Exon 1 entsprachen den Vorgaben der durchgehenden Sequenz (Fig. 6).

Für das Exon X4 war ebenfalls ein PCR Produkt in drei der fünf cDNAs nachweisbar. Hier ergab die Sequenzanalyse allerdings keine Übereinstimmung mit der bekannten Sequenz.

Im Gegensatz zu Exon 0K konnte das Exon X1 nur in zwei von fünf cDNAs gefunden werden. Analog zu den zuvor gefundenen Exons entsprach auch hier die Sequenzierung den Erwartungen und bestätigte die erwartete Größe und die Verbindung zwischen Exon X1 und Exon 1. Größe und Verbindung entsprachen der durchgehenden Sequenz aus Figur 6.

Mögliche Fehlerquellen wie defekte Primer und RNA Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze wurden schon in den vorhergehenden Kapitel diskutiert und sind auch für diese Zelllinie gültig. Es konnte die Expression der Exons 0K und X1 des ER $\beta$  in der Zelllinie MSC bewiesen werden. Bisher lagen in der Literatur noch keine Untersuchungen zu untranslatierten Exons des ER $\beta$  in mesenchymalen Stammzellen vor.

#### **4.3.4 T/C28a2**

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde diskutiert, dass die Konzentration von der zu untersuchenden RNA innerhalb der totalen RNA möglicherweise zu niedrig war, um mittels PCR bzw. nested-PCR nachgewiesen werden zu können. Ausgehend von dieser Vermutung und dem negativen Nachweis von ER $\beta$  in der aus polyA<sup>+</sup> RNA synthetisierten cDNA der Chondrozyten T/C28a2, wurde eine weitere totale RNA aus einer Zellkultur isoliert und revers transkribiert. In einem Experiment mit alternativen Primern

konnte im Agarosegel ein PCR Produkt nachgewiesen werden. Die Größe des Produktes entsprach nicht den Erwartungen, sondern war etwa 200 Nukleotide geringer, als nach der bekannten Sequenz zu erwarten gewesen wäre. Diese Diskrepanz könnte durch alternative Splicevorgänge zu erklären sein, aber die Sequenzierung des Produktes ergab keinerlei Übereinstimmung mit der Sequenz der ER $\beta$ . Damit konnte weder die Existenz von ER $\beta$ , noch das Vorliegen untranslatierter Exons von ER $\beta$  in der Zelllinie T/C28a2 belegt werden. In der Literatur wurden diese Zellen bisher weder auf die Expression von ER $\beta$ , noch auf untranslatierte Exons des ER $\beta$  untersucht. Ein Nachweis von ER $\beta$  existiert bisher lediglich in Chondrozyten aus Knorpelbiopsien (55).

#### **4.4 Nachweis des ER $\beta$ während der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen**

Die Untersuchung der Zelllinien MSC und hFOB hatte gezeigt, dass während der Differenzierung der Stammzellen offenbar zusätzliche Promotorregionen des ER $\beta$  Verwendung finden. Wurde in den Stammzellen noch die untranslatierten Exons 0K und X1 exprimiert, sind es in den Osteoblasten die Exons 0K, X1 und 0N. Die zusätzliche Verwendung eines untranslatierten Exons, und damit dessen Promotorregion, konnte gezeigt werden. Dies wirft die Frage auf, ob sich mit dieser Veränderung auch die Quantität des ER $\beta$  während der Differenzierung ändert.

Für die Experimente wurden MSC nach einer etablierten Methode osteogen differenziert (vgl. Kap. 2.2.2) und zu verschiedenen Zeitpunkten eine totale RNA isoliert und revers transkribiert. Es wurden insgesamt zwei unterschiedliche Zellkulturen benutzt. Die Anzahl der PCR Zyklen wurde in der nested-PCR von 40 auf 20 reduziert. Nach der Auftrennung im Gel konnte anhand der Intensität der Banden keine Aussage zu einer Veränderung in der Konzentration des ER $\beta$  gemacht werden. Da die PCR eher dem qualitativen Nachweis dient, scheint diese Untersuchungsmethode für eine verlässliche Aussage zu ungenau zu sein. Es sind weitere Untersuchungen mit einer Methode nötig, welche eine größere quantitative Sensitivität besitzt, um zu einem aussagekräftigen



Ergebnis zu kommen. Untersuchungen zur Veränderung der ER $\beta$  Konzentration in Zellen während der Differenzierung liegen bisher aus der Literatur nicht vor.

Analog zu der osteogenen Differenzierung können mesenchymale Stammzellen auch adipogen differenziert werden. Unterschiede in der Expression von untranslatierten Exons zwischen Stammzellen und Adipozyten wurden in dieser Arbeit zwar nicht untersucht, dennoch stellte sich die Frage nach einer Änderung der ER $\beta$  Konzentration ebenso wie im vorangegangenen Experiment. Für diese Untersuchung wurden drei Verschiedene MSC Zellkulturen nach einer etablierten Methode adipogen differenziert (vgl. Kap. 2.2.2). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine totale RNA isoliert und revers transkribiert. Die Bedingungen der nested-PCR wurden analog zu denen der osteogenen Differenzierung verändert. Auch hier konnten nach Auftrennung im Agarosegel keine quantitativen Unterschiede in der Intensität der Banden festgestellt werden. Die Problematik dieser Methode zur Untersuchung von quantitativen Unterschieden in der Konzentration wurde bei der osteogenen Differenzierung diskutiert. Auch hierzu gibt es in der Literatur noch keine Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Der Wirkung von Östrogenen fällt bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen im menschlichen Körper eine entscheidende Rolle zu. Daraus wiederum ergibt sich ein Ansatzpunkt für Therapien von Erkrankungen. Für viele Wirkungen der Östrogene sind die Östrogenrezeptoren verantwortlich, welche diese vermitteln. Damit in bestimmten Geweben die Östrogene eine bestimmte Wirkung hervorrufen können, muss die Expression von Östrogenrezeptoren unterschiedlich reguliert werden. Mit der Entdeckung der untranslatierten Exons wurde ein möglicher Regulationsmechanismus für die Expression von Östrogenrezeptoren gefunden.

Über die gewebespezifische Verwendung von untranslatierten Exons ist bisher nur wenig bekannt (Tab. 8).

Tab. 8: Bisher bekannte untranslatierte Exons der ER $\beta$  in humanen Zellsystemen

Exon	Hirata et al. (44)	Zhao et al. (57)	Vorliegende Arbeit
0K	Spermatozoen, Myometrium, Endometrium, Leberzellen, Leukozyten	Mammaepithelzellen, Brustkrebszellen	Neuroblastomzellen, fetale Osteoblasten, mesenchymale Stammzellen
X1			Neuroblastomzellen, fetale Osteoblasten, mesenchymale Stammzellen
X2			
X3			Neuroblastomzellen
X4			
X5			
0N	Spermatozoen, Myometrium, Endometrium, Leberzellen, Leukozyten	Mammaepithelzellen, Brustkrebszellen	fetale Osteoblasten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung von untranslatierten Exons in humanen fetalen Osteoblasten (hFOB), Neuroblastomzellen (SK-N-SH), mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Chondrozyten (T/C28a2) untersucht. Des Weiteren wurde die quantitative Expression von Östrogenrezeptor  $\beta$  während der Differenzierung von MSC zu Osteoblasten und Adipozyten untersucht.

Zu diesem Zweck wurde aus Zellkulturen gewonnenen Zellen RNA isoliert, mit deren Hilfe eine cDNA synthetisiert wurde. Diese wurde mittels PCR amplifiziert und die gewonnenen Produkte durch Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Zur Identifikation der PCR Produkte wurde sie einer Sequenzanalyse unterzogen.

Die Versuche konnten belegen, dass in den einzelnen Zelllinien untranslatierte Exons verwendet werden. Erstmals konnten untranslatierte Exons in fetalen Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die bei den einzelnen Zelllinien gefundenen Exons. Zudem konnte eine Splicevariante des Exons 1 bei fetalen Osteoblasten nachgewiesen werden.

Der Nachweis eines zusätzlichen untranslatierten Exons bei Osteoblasten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen zeigt, dass während Differenzierungsvorgängen zusätzliche Promotorregionen zur Expression des Östrogenrezeptor  $\beta$  genutzt werden.

Die Untersuchung der Expression des Östrogenrezeptor  $\beta$  während der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen konnte keine quantitativen Unterschiede aufzeigen. Die Verwendung von sensitiveren Analysemethoden könnte hier genauere Aussagen ermöglichen.

## 6 Abkürzungen

Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2	Östrogen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor alpha
ER $\beta$	Östrogenrezeptor beta
ERE	estrogen responsive element
ERKO	Östrogen knockout
hFOB	humane fetale Osteoblasten
HPLC	high performance liquid chromatography
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
kBp	Kilobasenpaare
LBD	Liganden bindende Domäne
LDL	low density lipoprotein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzellen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
SK-N-SH	Neuroblastomzellen
T/c28a2	Chondrozyten
TBE	Tribase-EDTA-Puffer
TE	tris-EDTA
tRNA	transfer RNA

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986 March 13;320(6058):134-9.
- (2) Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986 March 7;231(4742):1150-4.
- (3) Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 June 11;93(12):5925-30.
- (4) Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996 October;10(10):1167-77.
- (5) Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993 November 5;75(3):567-78.
- (6) Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994;63:451-86.
- (7) Rollerova E, Urbancikova M. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (Review). *Endocr Regul* 2000 December;34(4):203-18.
- (8) Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 1995 July;9(7):814-25.
- (9) Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2002 September;3(3):193-200.
- (10) Sanchez R, Nguyen D, Rocha W, White JH, Mader S. Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* 2002 March;24(3):244-54.
- (11) Rosen J, Day A, Jones TK, Jones ET, Nadzan AM, Stein RB. Intracellular receptors and signal transducers and activators of transcription superfamilies: novel targets for small-molecule drug discovery. *J Med Chem* 1995 December 8;38(25):4855-74.

- (12) Krishnan V, Wang X, Safe S. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1994 June 3;269(22):15912-7.
- (13) Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997 October;11(11):1569-80.
- (14) Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 1990 December 21;63(6):1267-76.
- (15) Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997 September 5;277(5331):1508-10.
- (16) Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 1994 June;15(3):275-300.
- (17) Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001 October;81(4):1535-65.
- (18) Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 December 1;90(23):11162-6.
- (19) Korach KS, Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Kimbro KS et al. Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res* 1996;51:159-86.
- (20) Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999 June;20(3):358-417.
- (21) Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 December 22;95(26):15677-82.
- (22) Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996 November;137(11):4796-805.
- (23) Albright F. *Annals of internal medicine*, Volume 27, 1947: Osteoporosis. *Nutr Rev* 1989 March;47(3):85-6.
- (24) Korach KS, Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Kimbro KS et al. Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res* 1996;51:159-86.

- (25) Migliaccio S, Newbold RR, Bullock BC, McLachlan JA, Korach KS. Developmental exposure to estrogens induces persistent changes in skeletal tissue. *Endocrinology* 1992 March;130(3):1756-8.
- (26) Lundeen SG, Carver JM, McKean ML, Winneker RC. Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology* 1997 April;138(4):1552-8.
- (27) Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR, Jr., Lubahn DB et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med* 1997 May;3(5):545-8.
- (28) Li LC, Yeh CC, Nojima D, Dahiya R. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 August 28;275(2):682-9.
- (29) Dang ZC, van Bezooijen RL, Karperien M, Papapoulos SE, Lowik CW. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res* 2002 March;17(3):394-405.
- (30) Chu S, Fuller PJ. Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol* 1997 September 19;132(1-2):195-9.
- (31) Hanstein B, Liu H, Yancisin MC, Brown M. Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol* 1999 January;13(1):129-37.
- (32) Zhao C, hlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 2008;6:e003.
- (33) Poola I, Abraham J, Baldwin K. Identification of ten exon deleted ERbeta mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor beta mRNA is distinct from that of estrogen receptor alpha. *FEBS Lett* 2002 April 10;516(1-3):133-8.
- (34) Lewandowski S, Kalita K, Kaczmarek L. Estrogen receptor beta. Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett* 2002 July 31;524(1-3):1-5.
- (35) Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 June 9;247(1):75-8.
- (36) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betax: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998 August 1;26(15):3505-12.
- (37) Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab* 2003 April;14(3):124-9.

- (38) Piva R, Bianchi N, Aguiari GL, Gambari R, del SL. Sequencing of an RNA transcript of the human estrogen receptor gene: evidence for a new transcriptional event. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993 November;46(5):531-8.
- (39) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 February 4;243(1):122-6.
- (40) Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1995 February;10(2):178-86.
- (41) Robbins JR, Thomas B, Tan L, Choy B, Arbiser JL, Berenbaum F et al. Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 2000 October;43(10):2189-201.
- (42) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 1992;24:17-27.
- (43) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 December;74(12):5463-7.
- (44) Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 July;78(1):33-40.
- (45) Lewandowski S, Kalita K, Kaczmarek L. Estrogen receptor beta. Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett* 2002 July 31;524(1-3):1-5.
- (46) Sand P, Luckhaus C, Schlurmann K, Gotz M, Deckert J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J Neural Transm* 2002 May;109(5-6):567-83.
- (47) Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 June 9;247(1):75-8.
- (48) Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab* 2003 April;14(3):124-9.
- (49) Pedeutour F, Quade BJ, Weremowicz S, Dal CP, Ali S, Morton CC. Localization and expression of the human estrogen receptor beta gene in uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 December;23(4):361-6.
- (50) Sand P, Luckhaus C, Schlurmann K, Gotz M, Deckert J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J Neural Transm* 2002 May;109(5-6):567-83.



- (51) Stark KD, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 1998 February;64(2):543-8.
- (52) Ba F, Pang PK, Davidge ST, Benishin CG. The neuroprotective effects of estrogen in SK-N-SH neuroblastoma cell cultures. *Neurochem Int* 2004 May;44(6):401-11.
- (53) Waters KM, Rickard DJ, Riggs BL, Khosla S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS et al. Estrogen regulation of human osteoblast function is determined by the stage of differentiation and the estrogen receptor isoform. *J Cell Biochem* 2001 August 21;83(3):448-62.
- (54) Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem Suppl* 2001;Suppl 36:144-55.
- (55) Richette P, Corvol M, Bardin T. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2003 August;70(4):257-62.
- (56) Sierens JE, Scobie GA, Wilson J, Saunders PT. Cloning of oestrogen receptor beta from Old and New World primates: identification of splice variants and functional analysis. *J Mol Endocrinol* 2004 June;32(3):703-18.
- (57) Zhao C, Lam EW, Sunters A, Enmark E, De Bella MT, Coombes RC et al. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* 2003 October 23;22(48):7600-6.



# Lebenslauf

- Persönliche Daten  
Name Markus Pfeiffer  
Geburtsdatum/-ort 30. Mai 1977 in Öhringen
- Schulbildung  
1983-1987 Silcher Grundschule Heilbronn  
1987-1996 Robert-Mayer-Gymnasium Heilbronn  
06/1996 Allgemeine Hochschulreife
- Ersatzdienst  
1997-1999 Rettungssanitäter beim DRK Heilbronn
- Hochschulstudium  
1999-2005 Studium der Humanmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
04/2001 Ärztliche Vorprüfung  
04/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und  
Approbation
- Famulaturen/praktisches Jahr  
08/2001 Famulatur Innere Medizin KKH Brackenheim  
08/2002 Famulatur Chirurgie KKH Lindau  
02/2003 Famulatur Innere Medizin Cairns/Australien  
09/2003 Famulatur Praxis für Anästhesiologie Würzburg  
04/2004 PJ Chirurgie Würzburg  
08/2004 PJ Anästhesiologie Würzburg  
11/2004 PJ Innere Medizin Würzburg
- Weiterbildung  
seit 06/2005 Arzt in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für  
Anästhesiologie der Universität Würzburg

Würzburg, Mai 2010