

**Aus dem Physiologischen Institut  
der Universität Würzburg**  
**Lehrstuhl für Physiologie – Schwerpunkt vegetative Physiologie**  
Vorstand: Prof. Dr. M. Kuhn

# **Mechanismus der schnellen Geninduktion von Egr-1 durch Östrogen am Herzen:**

Ein Steroidhormon geht neue Wege

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

vorgelegt von

**Stephan Müller-Botz**

aus Würzburg

Würzburg, im Juni 2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. K. Schuh  
Institut für Physiologie I der Universität Würzburg

Korreferent: Prof. Dr. med. M. Schmidt  
Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Der Promovend ist Facharzt für Allgemeinchirurgie und Notfallmedizin

**Meinen Eltern**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Zielsetzung .....	1
1.2	Bedeutung von Östrogen im kardiovaskulären System.....	1
1.3	Mechanismus der Östrogenwirkung.....	5
1.3.1	Der klassische Weg der Genregulation (direkte Genregulation durch Steroidhormone – direkter genomischer Östrogeneffekt).....	6
1.3.2	Indirekte genomische Östrogenwirkung.....	13
1.3.3	Nichtgenomische Östrogenwirkung .....	14
1.4	Egr-1 als Zielgen von Östrogen im Herzen .....	17
1.5	Zellkulturmodelle vom Herzen.....	18
1.6	Gentransfer-Methoden .....	19
1.6.1	Nichtvirale Transfektionsmethoden von Kardiomyozyten .....	20
1.6.2	Viral gestützte Transfektionsmethoden an Kardiomyozyten.....	22
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
3.1	Verwendete Plasmide .....	23
3.1.1	Beschreibung der verwendeten Plasmide .....	23
3.1.2	Kompetente Zellen und Transformation.....	25
3.1.3	Anzüchtung der Bakterien und Aufreinigung des Plasmids.....	26
3.1.4	Quantifizierung und Identifizierung der Plasmide .....	27
3.2	Adenovirus .....	27
3.2.1	Verwendeter Leervektor.....	27
3.2.2	Präparation und Purifikation.....	28
3.2.3	Quantifizierung der Adenoviruspräparation .....	29
3.3	Zellkulturen.....	29
3.3.1	HEK 293 .....	29
3.3.2	Neonatale Kardiomyozyten .....	30

<b>3.4 Nicht-virale Transfektionen .....</b>	<b>32</b>
3.4.1 Calcium-Phosphat .....	32
3.4.2 SuperFect.....	33
3.4.3 LipofectAMIN PLUS™.....	33
<b>3.5 Viral unterstützte Transfektion – Komponentensystem .....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Nachweismethoden .....</b>	<b>35</b>
3.6.1 Luciferase Assay .....	35
3.6.2 Beta-Galaktosidase-Färbung .....	36
3.6.3 Proteinmessung nach der Bio-rad Methode .....	37
3.6.4 Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Reinheit der Kardiomyozytenkultur und der Transfektionseffizienz .....	37
<b>3.7 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) .....</b>	<b>38</b>
3.7.1 Gewinnung von nukleären Extrakten .....	38
3.7.2 „Annealing“ von Oligonukleotiden .....	39
3.7.3 Labeling von Oligonukleotiden .....	39
3.7.4 Gelshift .....	40
<b>3.8 Western blot .....</b>	<b>41</b>
<b>4 RESULTATE .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Vergleich von viralen mit nichtviralen Transfektionssystemen an neonatalen Herzmuskelzellen .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Systemoptimierung des Komponentensystems .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Untersuchung der östrogenvermittelten Geninduktion anhand des Egr-1-Promotors.....</b>	<b>47</b>
4.3.1 Die Egr-1-Expression in Kardiomyozyten ist ein direkter Effekt von Östrogen.....	47
4.3.2 Der Egr-1-Promotor wird durch Östrogen 6-fach induziert .....	48
4.3.3 Die östrogenabhängige Induktion des Egr-1-Promotors erfolgt nicht über die ERE-, sondern über SRE-Bindungsstellen .....	50
4.3.4 Bedeutung der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$ und ER $\beta$ für die Regulation von Egr-1-luc durch Östrogen.....	53
4.3.5 Bedeutung der ERE im Vergleich zu den serumresponsiven Elementen (SRE) für die Egr- 1-Induktion in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren .....	59
4.3.6 Die östrogenabhängige Geninduktion des Egr-1-Promotors erfolgt durch Proteinbindung an serumresponsive Elemente (SRE) unter Beteiligung des Serumfaktors .....	65
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>

<b>5.1</b>	<b>Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2</b>	<b>Östrogenvermittelte Geninduktion in Kardiomyozyten .....</b>	<b>78</b>
<b>5.3</b>	<b>Unterschiedliche Effekte der Östrogenrezeptoren ER<math>\alpha</math> und ER<math>\beta</math> .....</b>	<b>81</b>
<b>5.4</b>	<b>Mechanismus des schnellen, nichtgenomischen Effekts von Östrogen auf Egr-1 .....</b>	<b>85</b>
<b>5.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>APPENDIX .....</b>	<b>120</b>
<b>8.1</b>	<b>Medien und Lösungen.....</b>	<b>120</b>
<b>8.2</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>123</b>
<b>8.3</b>	<b>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>124</b>
<b>8.4</b>	<b>Geräteverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>127</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine geeignete und effektive Methode für die transiente Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten mit Plasmiden zu etablieren. Mit Hilfe dieser Methode sollte im Anschluss in einer Promotorstudie die genregulatorische Wirkung von Östrogen an einem Zielgen von Östrogen im Herzen untersucht werden.

Da eine östrogenabhängige Induktion des frühen Wachstumsgens Egr-1 im Myokard bereits nachgewiesen war, sollte anhand des Egr-1-Promotors die Östrogenwirkung auf Herzmuskelzellen in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf zellulärer Ebene analysiert werden.

## 1.2 Bedeutung von Östrogen im kardiovaskulären System

Der Myokardinfarkt als Folge der koronaren Herzerkrankung (KHK) ist bis heute in den Industrienationen als häufigste Todesursache zu verzeichnen (Rosamond et al. 2008; Lloyd-Jones et al. 2009). Durch eine verbesserte klinische und präklinische Versorgung sowie eine Intensivierung primärer und sekundärer Prävention konnte in den letzten 50 Jahren eine Senkung des Mortalitätsrisikos beobachtet werden (Fox et al. 2004).

Die Inzidenz der KHK ist bei prämenopausalen Frauen deutlich niedriger als bei gleichaltrigen Männern und unabhängig von Lebensstil und Populationszugehörigkeit (Kalin, Zumoff 1990). Mit Eintritt der Menopause und hierbei sinkendem Östrogenspiegel ist allerdings für Frauen ein deutlicher Risikoanstieg mit einer erhöhten Inzidenz an kardiovaskulären Ereignissen festzustellen (Barrett-Connor 1997). Generell tritt eine Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen bei postmenopausalen Frauen im Durchschnitt um ca. 10 Jahre verzögert im Vergleich zu gleichaltrigen Männern auf (Kannel, Wilson 1995).

Eine protektive Wirkung des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen auf das Herzkreislaufsystem wurde bereits in den ersten Untersuchungen der Framingham-Studie postuliert, nachdem prämenopausale Frauen eine bessere Prognose bei symptomatischer KHK aufwiesen als gleichaltrige Männer, während zwischen postmenopausalen Frauen und Männern kein signifikanter Unterschied in der Prognose nachweisbar war (Ho et al. 1993). Auch bei einer iatrogenen vorzeitigen Menopause (durch Ovariectomie) bei prämenopausalen Frauen findet sich ein signifikanter Risikoanstieg in Bezug auf symptomatische koronare Herzerkrankung, der sich durch Östrogensubstitution wieder reduzieren lässt (Lobo 2007).

Verschiedene, zumeist pathologische Herzveränderungen wie Herzhypertrophie oder zelluläre Umbauvorgänge nach Myokardinfarkt (kardiales Remodeling) weisen ebenfalls geschlechtsspezifische Unterschiede auf (Dahlberg 1990; Marcus et al. 1994; Gardin et al. 1995).

So tritt bei Frauen insgesamt seltener eine Linksherzhypertrophie auf als bei Männern, während nach Eintritt der Menopause Frauen eine höhere Inzidenz an linksventrikulärer Hypertrophie aufweisen als gleichaltrige Männer (Agabiti-Rosei, Muiesan 2002).

Generell wird bei Vorliegen einer Linksherzhypertrophie der Krankheitsverlauf der koronaren Herzkrankheit dramatisch verschlechtert, das Risiko des plötzlichen Herztodes steigt hierbei um das Sechsfache an (Dunn, Pfeffer 1999). Die postmenopausal erhöhte Inzidenz an Linksherzhypertrophie kann durch eine Hormonersatztherapie (HRT: hormone replacement therapy) mit einem Östrogen enthaltenden Präparat wieder aufgehoben werden (Miya et al. 2002).

Zur Erklärung des kardioprotektiven Effekts von Östrogen existieren verschiedene Modelle:

Ein großer Forschungsschwerpunkt lag seit den ersten Untersuchungen auf dem positiven Östrogeneffekt auf das kardiovaskuläre System (Mendelsohn, Karas 1999). So erhöht sich beispielsweise das Atheroskleroserisiko mit Eintritt der Menopause deutlich im Vergleich zu prämenopausalen Frauen und zeigt eine mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Menopause progrediente Ausprägung (Dubey et al. 2005).



Zu den protektiven Östrogenwirkungen zählt die Verbesserung der Lipidparameter im Serum (Erhöhung des HDL – high density lipoprotein und gleichzeitige Verminderung des LDL – low density lipoprotein), was ebenfalls als eigenständiges Therapieregime zur primären und sekundären Prävention bei KHK durch Statine von der American Heart Association (AHA) empfohlen wird (Smith et al. 2001).

Weiterhin weist Östrogen einen schnell eintretenden vasodilatativen Effekt auf, der durch eine direkte Beeinflussung der endothelialen NO-Freisetzung vermittelt wird (Mendelsohn, Karas 1999), womit die bereits in den 1970er Jahren erkannte blutdrucksenkende Wirkung von Östrogen (Pfeffer et al. 1979) auch auf zellulärer Ebene nachvollziehbar wurde. Darüber hinaus ist eine Beeinflussung vasoaktiver Systeme wie Prostacyclin und Thromboxan (Mück et al. 1993) sowie die Freisetzung von cGMP in Endothelzellen (Mück et al. 1994 a) mit konsekutiver Vasodilatation für Östrogen nachgewiesen (Mück et al. 1994 b).

Anderen Erklärungsansätzen zufolge üben Östrogene eine antiproliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen aus, denen ein Schlüsselprozess bei der Atherogenese und Entstehung von Plaquerupturen und akuten Koronarverschlüssen (Yang et al. 2009) zukommt, was sowohl durch *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Raines, Ross 1993; Vargas et al. 1993; Suzuki et al. 1996).

In gleicher Weise wird durch Östrogen eine schnellere Erholung von Endothelzellen nach Verletzung durch Ballondilatation bewirkt (Krasinski et al. 1997).

Auch auf zellulärer Ebene lässt sich ein Zusammenhang zwischen koronarer Herzerkrankung und Östrogen nachweisen, da eine verminderte Expression des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  mit einer erhöhten Inzidenz an kardiovaskulären Erkrankungen einhergeht (Losordo et al. 1994).

Aktuelle Studien weisen auf eine Assoziation von Polymorphismen des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  und Ausprägung der koronaren Herzkrankheit bei Männern und Frauen gleichermaßen hin. Die bei Männern bereits festgestellte Beeinflussung der KHK durch bestimmte ER $\alpha$ -Polymorphismen (Shearman et al. 2006) scheint auch bei Frauen zu bestehen (Alevizaki et al. 2007). Offenbar beeinflusst die Expression bestimmter Haplotypen des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  die Ansprechbarkeit auf eine Hormonersatztherapie und könnte die Ursache für ein unterschiedliches kardiovaskuläres Risikoprofil für Frauen sein (Lawlor et al. 2006).

Auf Zellebene lassen sich ebenfalls geschlechtsspezifische unterschiedliche Genregulationsmechanismen bei erhöhter kardialer Nachlast durch Aortenkonstriktion am Mausmodell nachweisen (Witt et al. 2008). So findet sich eine Reduktion kardialer Hypertrophie bei Aortenkonstriktion unter Östrogensubstitution ovariectomierter Mäuse *in vivo* wie auch auf zellulärer Ebene unter Vermittlung durch  $17\beta$ -Östradiol (Donaldson et al. 2009).

Eine direkte protektive Wirkung von Östrogen auf das Myokard konnte *in vivo* und *in vitro* anhand einer reduzierten Apoptoserate durch Östrogensubstitution bei myokardialer Ischämie gezeigt werden (Pelzer et al. 2000; Patten et al. 2004; Kim et al. 2006; Satoh et al. 2007).

Eine verbesserte Reaktion auf eine definierte Verletzungsschwere ist durch Östrogensubstitution im Mausmodell mit einer erhöhten Überlebensrate korreliert und wird durch die Inhibition einer hyperinflammatorischen Immunantwort erklärt (Kovacs et al. 2004). Ebenso reduziert Östrogen rezeptorvermittelt die vaskuläre Leukozytenakkumulation im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens (Simoncini et al. 2003).

Die nach tierexperimenteller Herztransplantation (mit anhängender Aorta) detektierbare erhöhte vaskuläre Expression des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  (im Vergleich zur basalen Expressionsrate) wird ebenfalls als Schutzmechanismus gegen Transplantationsarteriosklerose angesehen (Lou et al. 1998).

Darüber hinaus wird bei Vorhandensein beider Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  in Mitochondrien und nachweisbaren östrogeninduzierten Genprodukten offenbar auch der Zellstoffwechsel und die mitochondriale Aktivität durch Östrogen moduliert (Klinge 2008).

Die Ergebnisse klinischer Studien unter postmenopausaler Östrogensubstitution in Bezug auf sekundäre Prävention kardiovaskulärer Ereignisse sind enttäuschend.

Die Untersuchungen von Östrogenwirkungen auf zellulärer Ebene zeigen, dass die östrogenvermittelte Genregulation im kardiovaskulären System einen komplexen und bislang nur ansatzweise verstandenen Regulationsmechanismus darstellt, aus dem sich aufgrund der zahlreichen Wechselwirkungen bislang keine klinischen Therapiestrategien ableiten lassen (Hulley et al. 1998; Furberg et al. 2002).

Die zunehmenden Erkenntnisse der differenzierten Östrogenwirkung auf verschiedene zelluläre Regulationsmechanismen lässt für die Zukunft neben einem besseren Verständnis der intrazellulären Prozesse eine gezielte Beeinflussung positiver Östrogeneffekte auf das kardiovaskuläre System erwarten.

### **1.3 Mechanismus der Östrogenwirkung**

Das weibliche Geschlechtshormon Östrogen gehört zur großen Familie der Steroidhormone, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zelldifferenzierung und Proliferationsprozessen von verschiedenen Zelltypen spielen.

Östrogene sind definiert als natürlich vorkommende Aktivatoren des Östrogenrezeptors. Das Östrogen mit der höchsten Prävalenz und der größten biologischen Aktivität stellt  $17\beta$ -Östradiol dar. Östrogen wird vorwiegend in den Ovarien und Fettgewebe durch die Umwandlung von Testosteron zu  $17\beta$ -Östradiol hydroxyliert (katalysiert durch das Enzym Aromatase).

Die chemische Ausgangsverbindung der Steroidhormone ist Pregnenolon, das in drei chemischen Schritten aus Cholesterin synthetisiert wird.

Steroidhormonrezeptoren bilden eine Untergruppe der Familie der nukleären Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren durch direkte Bindung an spezifische DNA-Abschnitte im Bereich der Startsequenzen für die Transkription von Genen eine genregulierende Funktion ausüben (Evans 1988; Truss, Beato 1993; Beato et al. 1996a).

Nukleäre Rezeptoren weisen neben einer genetisch konservierten N-terminalen Region mit transaktivierender (= genaktivierender) Funktion eine zentral lokalisierte und hoch konservierte DNA-bindende Domäne (DBD) (Parker 1998) sowie eine C-terminale Domäne zur Vermittlung von Ligandenbindung (LBD – ligand binding domain), Rezeptordimerisation und transaktivierender Funktion auf (Gronemeyer, Laudet 1995).

Zu den Steroidhormonrezeptoren gehören die Rezeptoren für Gluko- und Mineralokortikoide, Progesteron, Androgene und Östrogen (Beato et al. 1996b).

Eine Sonderstellung in der Steroidrezeptorfamilie nehmen zwei mit dem Östrogenrezeptor verwandte Rezeptoren, ERR-1 und 2 (estrogen receptor related

receptor) ein (Giguère et al. 1988; Laudet et al. 1992). Diese Rezeptorengruppe zeichnet sich durch das Fehlen einer Ligandenbindung aus (sog. orphan receptors) und zeichnet für eine inhibierende Funktion verantwortlich. In neueren Studien konnte des Weiteren eine wichtige Rolle für die Regulation des kardialen Energiestoffwechsels gezeigt werden (Huss, Kelly 2004), woraus sich auch eine zunehmende pathophysiologische Bedeutung für die kardiale Adaptation an Drucküberlastung und Hypertrophieentwicklung ergibt (Huss et al. 2007).

Neben den Steroidhormonrezeptoren beinhaltet die Gruppe der nukleären Rezeptoren auch den Thyreoidrezeptor sowie Rezeptoren für Vitamin D3 und Retinsäure.

Allen nukleären Rezeptoren ist die Fähigkeit gemeinsam, nach ligandenabhängiger Aktivierung eine direkte DNA-Bindung einzugehen und damit als Transkriptionsfaktor zu wirken.

Nach der Identifikation des Gens des humanen Glukokortikoidrezeptors (Hollenberg et al. 1985) und der Entdeckung des Östrogenrezeptors (Walter et al. 1985) folgte die Klonierung des 66 kDa großen Östrogenrezeptors (Green et al. 1986b). Eine Umbenennung des primär entdeckten Östrogenrezeptors in Östrogenrezeptor ER $\alpha$  erfolgte nach der Klonierung eines zweiten Östrogenrezeptors ER $\beta$  (Kuiper et al. 1996; Tremblay et al. 1997). Durch Untersuchungen zur Funktion und der Entdeckung weiterer durch nukleäre Rezeptoren regulierter Gene gelang ein weitreichender Einblick in die molekularbiologischen Grundlagen der Genregulation (Green, Chambon 1988).

### 1.3.1 Der klassische Weg der Genregulation (direkte Genregulation durch Steroidhormone – direkter genomischer Östrogeneffekt)

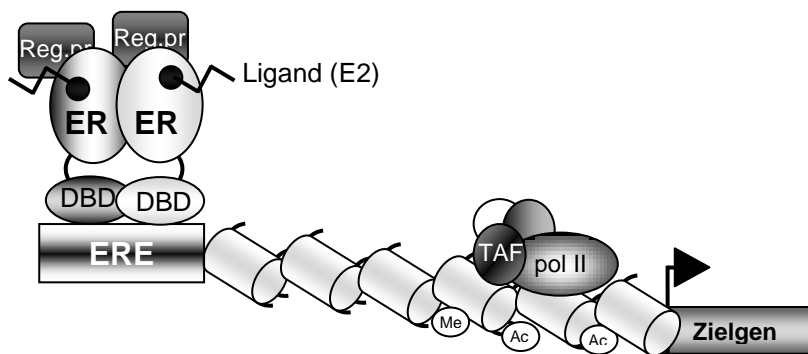
Östrogen entfaltet als Steroidhormon durch Ligandenbindung an den Östrogenrezeptor mit anschließender Besetzung spezifischer genregulatorischer DNA-Elemente transkriptionelle Aktivität (klassische Genregulation der Steroidhormone).

Dieser klassische Mechanismus der Östrogenwirkung erfolgt durch eine intrazelluläre Bindung des Hormons an den Östrogenrezeptor, der nach erfolgter Ligandenbindung und Dimerbildung in den Zellkern transloziert (Jensen et al. 1968; Hall, McDonnell

1999; Osborne, Schiff 2005). Hier kann der Rezeptor-Hormon-Komplex entweder ohne direkte DNA-Bindung mit anderen genregulatorisch wirkenden Proteinen interagieren (Gaub et al. 1990; Paech et al. 1997; Björnström, Sjöberg 2002) oder direkt an intranukleäre Gensequenzen binden (Nilsson et al. 2001).

Diese spezifischen DNA-Abschnitte werden als östrogenresponsive DNA-Elemente (ERE: estrogen responsive elements) bezeichnet (Kumar, Chambon 1988). Die in der Promotorregion lokalisierten ERE stellen die für östrogenmodulierten Gene entscheidenden genregulatorischen Sequenzen dar (Nilsson et al. 2001).

Verantwortlich für die Erkennung der spezifischen DNA-Bindungs-elemente durch einen Steroidhormonrezeptor ist die DNA-bindende Domäne des Rezeptors (DBD: DNA binding domain), die durch ca. 65-70 Aminosäuren definiert wird (Kumar et al. 1986). Sie stellt strukturell zwei Zinkfinger-motive dar, wobei hier eine Helix eine DNA-erkennende Funktion aufweist (sog. P-Box), während eine zweite Helix (sog. D-Box) für die Rezeptordimerisation verantwortlich ist (Luisi et al. 1991; Schwabe et al. 1993; Rastinejad et al. 1995).



**Abb. 1.3-1: Schema der DNA-Aktivierung (direkte genomische Wirkung) nukleärer Hormonrezeptoren am Beispiel des Östrogenrezeptors**

Der Östrogenrezeptor (ER) stellt einen typischen Vertreter der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren dar. Nach Rezeptoraktivierung durch erfolgreiche Ligandenbindung (E2: 17 $\beta$ -Östradiol) bindet er typischerweise als Rezeptordimer an die spezifischen östrogenresponsiven Elemente (ERE). Die Erkennung der ERE erfolgt durch die DNA-bindende Domäne des Rezeptors (DBD: DNA binding domain), die bei beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  eine 96%ige Homologie aufweist. Ligandenaktivierte Hormonrezeptoren benötigen weitere Transaktivator-Proteine (TAF: transactivation factors), um eine Genexpression bewirken zu können. Daneben spielen Regulationsproteine (Reg.prot.) bei der Rezeptoraktivierung und DNA-Bindung eine Rolle.

Grafik modifiziert nach Huss und Kelly (2004).

Die Abb. 1.3-1 zeigt den Mechanismus der direkten Geninduktion durch den Östrogenrezeptor, der auch als „klassischer“ oder direkter genomischer Effekt von Steroidhormonrezeptoren beschrieben ist.

Sowohl durch die Ligandenbindung des Rezeptors als auch durch die Bindung des Rezeptors an die spezifische DNA-Sequenz wird eine Konformationsänderung des Rezeptors wie auch der DNA-Struktur initiiert, durch die eine Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Regulatorproteinen ermöglicht wird. Die Bindung von Östrogen an den Rezeptor bewirkt neben der Abspaltung des Hitzchockproteins HSP 90 eine Konformationsänderung des Rezeptors (Beato 1989; Tsai, O'Malley 1994; Yamashita 1998).

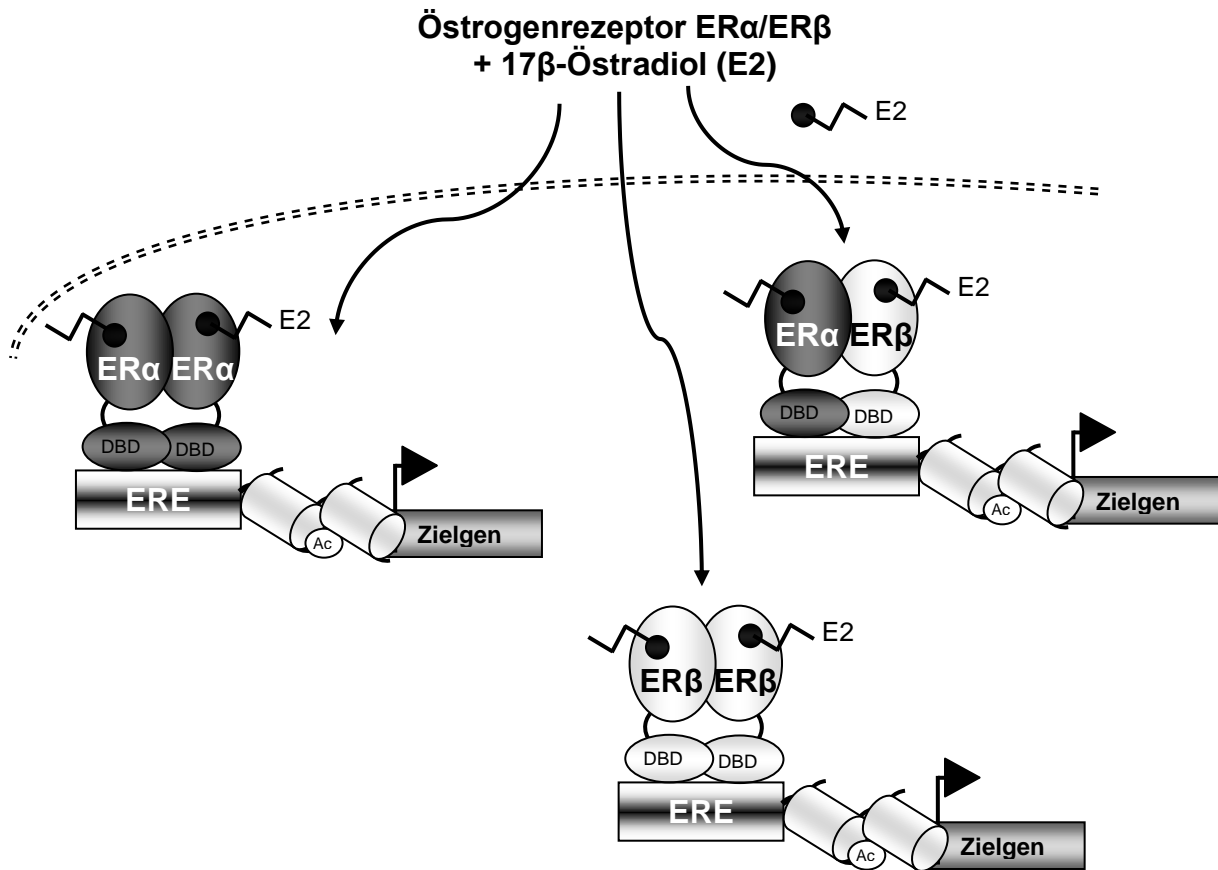
Analog erfolgt nach DNA-Bindung des Rezeptors durch die Modifikation der Tertiärstruktur von DNA und Rezeptor eine dadurch ermöglichte neue Bindungsoption für Regulatorproteine, während bestimmte repressiv wirkende Proteine abgespalten werden (Mahmoodzadeh et al. 2008).

Über Adapterproteine ist eine Interaktion und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren über die Ligandenbindungsdomäne der Steroidrezeptoren möglich (Hall, McDonnell 2005). Diese Faktorenkomplexe beinhalten ATP-abhängige strukturmodulierende Proteine wie Histon-Acetylasen und Histon-Methyltransferasen, durch die die Chromatinstruktur geöffnet und eine Bindungsmöglichkeit für Transkriptionskomplexe mit RNA-Polymerase II geschaffen wird, um ein Gentranskript zu initiieren.

Sowohl der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  können eine spezifische Bindung mit östrogenresponsiven Elementen (ERE) eingehen. Unter Besetzung der LBD (ligand binding domain) durch Östrogen verlieren die Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  auch unter erhöhten Temperaturbedingungen ihre ERE-Bindungsfähigkeit nicht. Bei fehlendem Liganden oder Anwesenheit eines Östrogenantagonisten wird die Bindungsfähigkeit von beiden Rezeptoren reduziert (Pace et al. 1997).

Beide Östrogenrezeptoren sind in der Lage, an spezifische östrogenresponsive DNA-Elemente (ERE) als Dimer zu binden und dadurch eine Genaktivierung zu bewirken (Kuiper et al. 1996; Mosselman et al. 1996). Dabei lassen sich sowohl Homodimere (ER $\alpha$ -ER $\alpha$  oder ER $\beta$ -ER $\beta$ ) als auch Heterodimere (ER $\alpha$ -ER $\beta$ ) unabhängig vom Vorhandensein eines Liganden (17 $\beta$ -Östradiol) oder eines Antagonisten wie ICI 182780 nachweisen (Pace et al. 1997).

Durch die unterschiedliche zelltypabhängige Verteilung der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  ergibt sich ein gewebespezifisches Genexpressionsmuster in Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität der beiden Rezeptoren und dem zellulären Verteilungsmuster.



**Abb. 1.3-2: Bindungsverhalten der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  an ERE**

Bei der klassischen Geninduktion durch Östrogen bindet 17 $\beta$ -Östradiol nach Diffusion in das Zellinnere an den Östrogenrezeptor. Durch die damit erfolgte Aktivierung der Östrogenrezeptoren werden die Dimerbildung und die anschließende Diffusion in den Zellkern (Nucleus) initiiert.

Bei der Dimerbildung der Östrogenrezeptoren sind sowohl Homodimere (ER $\alpha$ -ER $\alpha$  oder ER $\beta$ -ER $\beta$ ) als auch Heterodimere (ER $\alpha$ -ER $\beta$ ) möglich.

Durch zellspezifisch unterschiedliche Rezeptorexpression ergibt sich so ein zelltypisches Genexpressionsmuster.

Wie bei allen nukleären Rezeptoren finden sich beim Östrogenrezeptor ER $\alpha$  wie auch bei ER $\beta$  eine aus 6 sog. Domänen bestehende Grundstruktur, die unterschiedlich stark konservierte Regionen (A bis F) aufweist (vgl. Abb. 1.3-3).

Die DNA-bindende Domäne (Region C) einschließlich der P-Box zeigt mit 96% eine hohe Homologie bzw. identische Aminosäuresequenzen (P-Box) bei den Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ .

Dagegen finden sich in der Region E, in der die Hormon-/Ligandenbindungsdomäne liegt, deutliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Green et al. 1986a; Kumar et al. 1987).

Ebenso weist die N-terminale A/B-Region Spezies-abhängige Divergenzen auf. Hierin enthalten ist eine konstitutive Transkription-aktivierende Funktion (TAF-1), die eine promotor- und zelltypabhängige Genaktivierung unabhängig von der in der Domäne E befindlichen TAF-2 bewirken kann (Metzger et al. 1995a).

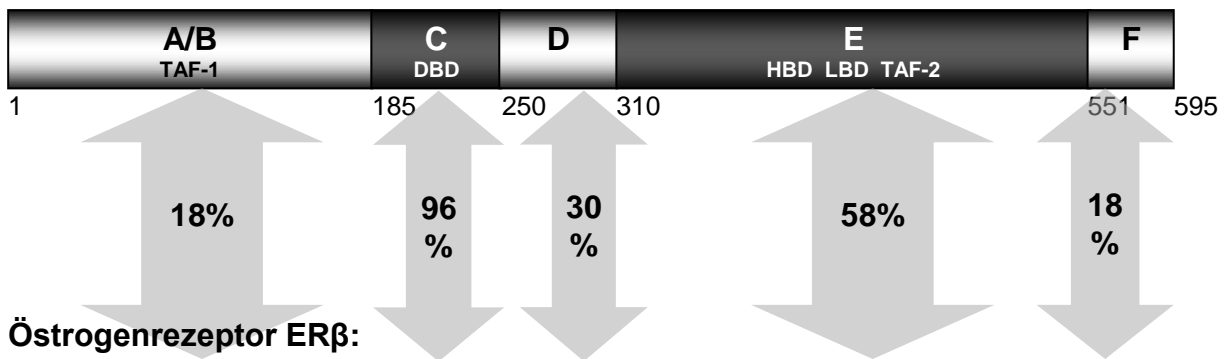
Im Gegensatz dazu ist die Wirkung der TAF-2 ligandenabhängig.

Das Antiöstrogen ICI 182780 wirkt über eine Blockade von AF-1 und AF-2 inhibitorisch, ohne allerdings die DNA-Bindung des Östrogenrezeptors über die DBD außer Kraft zu setzen (Metzger et al. 1995b).

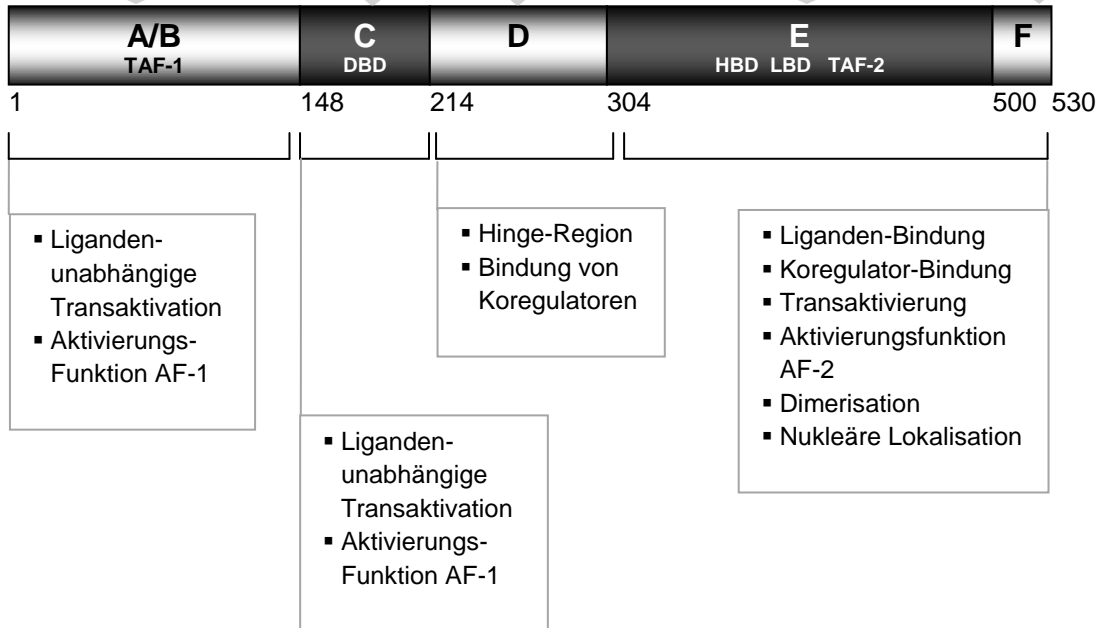
Dagegen blockiert Tamoxifen lediglich die transaktivierende Funktion AF-2, während die transkriptionelle Aktivität durch AF-1 ermöglicht wird (Berry et al. 1990; Metzger et al. 1995a; McInerney, Katzenellenbogen 1996).



**Östrogenrezeptor ER $\alpha$ :**



**Östrogenrezeptor ER $\beta$ :**



**Abb. 1.3-3: Proteinstruktur des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  im Vergleich zu ER $\beta$**

Die Östrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  gehören zur Superfamilie der Steroidrezeptoren und weisen wie andere Rezeptoren aus dieser Gruppe eine ähnliche Molekülstruktur auf, die aus sechs Domänen besteht (N-terminales Ende: Domäne A, C-terminales Ende: Domäne F).

Die höchste Homologie findet sich mit 96% in der Domäne C (Enmark et al. 1997), die über die DNA-bindende Domäne (DBD) mit zwei Zinkfingerstrukturen im Wesentlichen für die DNA-Bindung des Rezeptors verantwortlich ist. Insbesondere die für die Transaktivierung (Aktivierungsfunktion 1 und 2) und Bindung von Koregulatoren zuständigen Regionen (N-terminale A/B-Domäne und C-terminale E-Domäne) weisen deutliche Unterschiede in der Proteinstruktur auf. Die im Amino-terminalen Bereich gelegene Aktivierungsfunktion AF-1 bewirkt eine ligandenunabhängige transkriptionelle Aktivierung. Domäne D beinhaltet die Hinge-Region und Bindungsstellen von regulatorisch wirkenden Proteinen. Für die im C-terminalen Ende liegenden F-Domäne wird eine Funktion zur Konformationsänderung des Rezeptors nach Ligandenbindung angenommen, wodurch sich auch unterschiedliche Antworten des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  und ER $\beta$  gegenüber Östrogen und selektiven Östrogenmodulatoren erklären lassen (Brzozowski et al. 1997).

Die arabischen Zahlen geben die Position der Aminosäuren wieder. Die grau unterlegten Pfeile stellen die Homologien der Aminosäuresequenzen von ER $\alpha$  und ER $\beta$  dar.

Der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  zeichnet sich durch eine wesentlich höhere Aktivität der AF-1-Region aus, während die AF-1-Region von ER $\beta$  eher eine Repressordomäne darstellt (Cowley, Parker 1999; Hall, McDonnell 1999). So ist die Expression von Genen, die durch AF-1 und AF-2 transaktiviert werden, unter ER $\alpha$  höher als bei ER $\beta$ . Dagegen weisen AF-2-regulierte Gene keine Unterschiede der Transaktivierung durch ER $\alpha$  oder ER $\beta$  auf (Cowley, Parker 1999).

Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass die AF-1-Region des Östrogenrezeptors ER $\beta$  offenbar für die transkriptionelle Repression der ER $\alpha$ -Aktivität verantwortlich ist (Gougelet et al. 2007).

Die Domäne D ist durch die Bindungsfähigkeit verschiedener regulatorischer Proteine gekennzeichnet. Diese Region zeichnet sich durch die Bindungsfähigkeit von verschiedenen Signalproteinen für die Kernlokalisation wie auch des Hitzeschockproteins HSP 90 aus (Chambraud et al. 1990; Ylikomi et al. 1992) und ist an der Stabilisierung der DNA-Bindung des Rezeptors beteiligt (Mader et al. 1989; Mader et al. 1993).

Neben den beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  existieren verschiedene Splicing-Varianten mit teilweise noch ungeklärter Funktionalität.

So wird von der natürlich exprimierten Variante des Östrogenrezeptors ER $\Delta$ E7 aufgrund der nachgewiesenen ligandenunabhängigen Dimerisationsfähigkeit mit ER $\alpha$  und ER $\beta$  eine Unterdrückung der direkten transaktivierenden Funktion von ER $\alpha$  und ER $\beta$  angenommen (Garcva et al. 2003). Bereits 1996 wies die Arbeitsgruppe von Katzenellenbogen auf eine Variante des humanen Östrogenrezeptors mit fehlender DNA-Bindungsfähigkeit und negativer Transkriptionsaktivität bei gleichzeitiger Expression des Wildtyp-Rezeptors hin (McInerney et al. 1996).

Neben einer repressiven Wirkung einer 46 kDa großen Splicing-Variante von ER $\alpha$  (ER46) durch Fehlen der Transaktivationsfunktion TAF-1 (Flouriot et al. 2000) ist für ER46 eine membrangebundene Vermittlung nichtgenomischer schneller Östrogenwirkung über zelluläre Signalkaskaden nachgewiesen (Li et al. 2003).

Für die mittlerweile fünf nachgewiesenen ER $\beta$ -Isoformen (ER $\beta$ 2-5 als vom originären ER $\beta$ (1)-Rezeptor abweichende Isoformen) wird eine verstärkende Funktion

angenommen, da bei Fehlen von ER $\beta$ (1) keine eigenständige Genaktivierung stattfinden kann (Leung et al. 2006).

### 1.3.2 Indirekte genomische Östrogenwirkung

Etwa ein Drittel der östrogenregulierten Gene des Menschen weist keine östrogenspezifischen Gensequenzen (östrogenresponsive Elemente, ERE) auf (O'Lone et al. 2004). Die genauen Mechanismen der Regulation über alternative Genelemente sind noch nicht vollständig erforscht.

Östrogenrezeptoren sind in der Lage, ohne direkte DNA-Bindung über eine Modulation von Transkriptionsfaktorkomplexen die Genexpression zu beeinflussen (Göttlicher et al. 1998).

Ein typisches Beispiel für einen nicht-ERE-vermittelten (und damit indirekten) genomischen Östrogeneffekt ist die Genaktivierung durch die Interaktion des Östrogenrezeptors mit dem Aktivatorproteins 1 (AP-1). In diesem Fall interagiert der Östrogenrezeptor mit den Proteinen Fos und Jun, die wiederum die AP-1-Bindungsstelle besetzen und damit eine Genaktivierung bewirken. Eine direkte DNA-Bindung des Östrogenrezeptors findet dabei nicht statt.

Zu den auf diese Art östrogenabhängig regulierten Genen gehören das Gen für Ovalbumin (Gaub et al. 1990), Kollagenase (Webb et al. 1995), IGF-I (Umayahara et al. 1994) und Cyclin D1 (Sabbah et al. 1999; Liu et al. 2002).

In ähnlicher Weise werden die Gene für den LDL-Rezeptor (Li et al. 2001), für c-fos (Duan et al. 1998) und Cyclin D1 (Castro-Rivera et al. 2001) durch einen Aktivierungskomplex aus Östrogenrezeptor und dem Transkriptionsfaktor Sp1 (ER-Sp1) reguliert (Safe 2001).

Die Genregulation über eine Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren ohne direkte DNA-Bindung des Rezeptors ist ein typisches Merkmal der Steroidrezeptorfamilie und wird als „transkriptioneller cross-talk“ bezeichnet (Göttlicher et al. 1998).

### 1.3.3 Nichtgenomische Östrogenwirkung

Neben dem genregulatorischen Östrogeneffekt mit Aktivierung oder Unterdrückung der Transkription verschiedener Zielgene sind zelluläre östrogenabhängige Wirkungen nachweisbar, die zu schnell ablaufen, um mit transkriptionellen Prozessen unter Aktivierung der RNA- und Proteinsynthese kompatibel zu sein.

Diese innerhalb von Minuten nachweisbaren Zellveränderungen erfolgen über die Aktivierung verschiedener Proteine der zellulären Signalkaskaden und werden daher als nichtgenomische Östrogeneffekte bezeichnet (Lösel, Wehling 2003).

Typischerweise können diese Effekte auch durch nicht-membranpermeable Steroidhormone (z.B. an BSA-gekoppeltes Östradiol, das als Makromolekül nur an der Membranoberfläche und nicht transkriptionell im Zellkern wirken kann) hervorgerufen werden (Razandi et al. 2000).

Eine Beteiligung von membrangebundenen Östrogenrezeptoren wird diskutiert, zumal in verschiedenen Zellsystemen, wie z.B. Endothelzellen, Membranrezeptoren aus der Östrogenrezeptorfamilie nachgewiesen werden konnten (Simoncini et al. 2003). Schon in den späten 70iger Jahre gab es erste Vermutungen eines membrangebundenen Östrogenrezeptors durch den Nachweis spezifischer Bindungsstellen in der Zellmembran für Östrogen (Pietras, Szego 1977).

Die genauen Eigenschaften und Funktion der Zellmembranrezeptoren sind bisher noch nicht im Detail geklärt.

Die meisten Autoren sind der Ansicht, dass es sich bei den Membranrezeptoren um eine Subpopulation der klassischen Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  handelt (Pappas et al. 1995; Razandi et al. 1999). Transfektionsexperimente konnten in CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) transient transfizierte Östrogenrezeptoren sowohl im Zellkern als auch in geringem Umfang membranständig nachweisen (Razandi et al. 1999).

Man geht davon aus, dass die membranären Östrogenrezeptoren eine Untergruppe aus dem Pool der nukleären Rezeptoren bilden, die durch eine definierte Lokalisierungssequenz (bestehend aus 9 Aminosäuren in der Domäne E) unter Bindung an Caveolin-1 in die Zellmembran translozieren (Razandi et al. 2003; Acconcia et al. 2005; Pedram et al. 2007).

Andere Autoren bevorzugen die Theorie einer eigenständigen Rezeptorengruppe, die nicht aus den klassischen Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  hervorgeht (Toran-Allerand et al. 2002). Allerdings bestehen die in Zellmembranen bisher nachgewiesenen Östrogenrezeptoren allesamt aus den klassischen Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ , oder sind verkürzte Splicing-Varianten der Östrogenrezeptorgruppe.

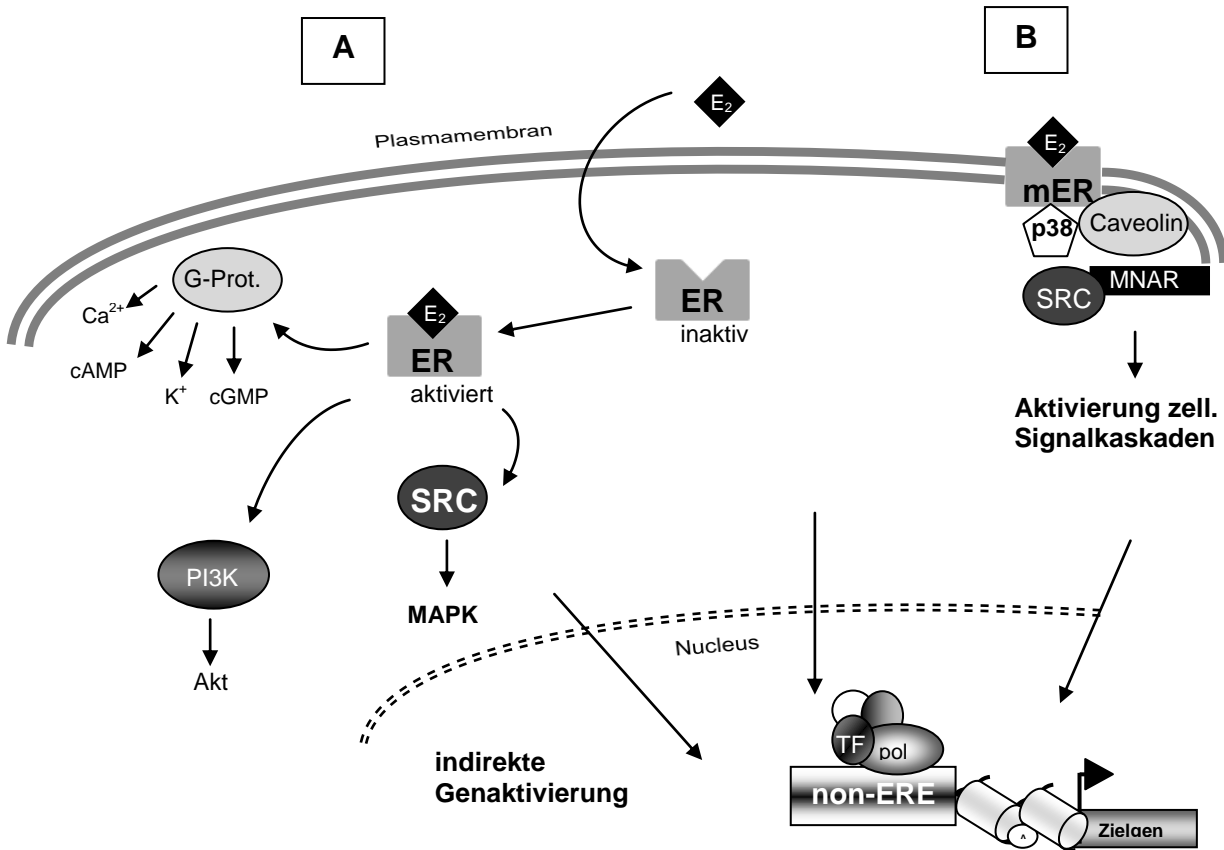
Generell besitzen die membranären Östrogenrezeptoren keine transmembranäre Domäne, so dass die Bindungstheorie an Proteine der Zellmembran nach vorangegangener Palmitoylation des Rezeptors am wahrscheinlichsten anzusehen ist (Li et al. 2003; Acconcia et al. 2005).

Interessanterweise erfolgt eine Aktivierung von Signalkaskaden im Gegensatz zu den cytoplasmatischen Rezeptoren nur über Homodimere (Razandi et al. 2004).

In verschiedenen Zellarten wie z.B. Endothelzellen sind membranständige Östrogenrezeptoren in sog. „Caveolae“, speziellen Membraninvaginationen mit einem Proteingerüst aus Caveolin, nachgewiesen. Über die in Caveolae befindlichen Östrogenrezeptoren wird die endotheliale NO-Synthase durch Phosphorylierung östrogenabhängig aktiviert (Kim et al. 1999; Chambliss et al. 2000; Chambliss et al. 2002). Caveolin ermöglicht hierbei die Anbindung an eine Vielzahl von Signalmolekülen (Shaul, Anderson 1998).

Allerdings sind die genauen Mechanismen und Regulationsvorgänge der membranären Translokation von Östrogenrezeptoren nicht im Detail geklärt.

Da die nichtgenomischen Östrogeneffekte auf zelluläre Signalkaskaden zurückgreifen, die üblicherweise von Membranrezeptoren initiiert werden, wurde der Begriff „membran-initiated steroid signaling“ (MISS) gebildet (Kim, Levin 2006).



**Abb. 1.3-4: Modell der nichtgenomischen rezeptorvermittelten Östrogenwirkung**

Neben den beiden klassischen Östrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  sind sog. Splicing-Varianten vorhanden, zu denen auch membranständige Östrogenrezeptoren zählen. Aktivierte Östrogenrezeptoren finden sich sowohl im Bereich der Zellmembran (B) als auch cytoplasmatisch (A). Über beide Rezeptortypen können schnelle Östrogeneffekte unter Nutzung zellulärer Signalwege abgewickelt werden.

Über die östrogenrezeptorvermittelte Aktivierung von klassischen zellulären Signalkaskaden wie z.B. MAPK erfolgt die Vermittlung schneller Östrogeneffekte, die entweder zelluläre Veränderungen (z.B. Änderung der Ionenkonzentration und des Ruhepotentials) nach sich ziehen, oder über weitere Signalkaskaden zu einer veränderten Genexpression führen können (sog. indirekter genomischer Östrogeneffekt).

**Abkürzungen:**

<b>E2</b>	17 $\beta$ -Östradiol	<b>PI3K</b>	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
<b>ER</b>	Östrogenrezeptor	<b>Pol</b>	Polymerase II
<b>mER</b>	membranständiger Östrogenrezeptor	<b>SRC</b>	Steroid-Rezeptor-Coaktivator-Familie
<b>MNAR</b>	Modulator of nongenomic activity of estrogen receptor, auch PELP-1	<b>TF</b>	Transkriptionsfaktor
<b>non-ERE</b>	nicht-östrogenresponsives Element		

In Kardiomyozyten sind sowohl der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  wie auch ER $\beta$  vorhanden. Beide Rezeptorsubtypen sind im Zellinneren ebenso wie in der Zellmembran als funktionell aktive Rezeptoren nachgewiesen (Chambliss et al. 2002).

Während ER $\alpha$  vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist und nur eine geringe cytoplasmatische Konzentration aufweist, zeigt sich ER $\beta$  vorwiegend im Cytoplasma bei nur geringer intranukleärer Konzentration. Beide Rezeptoren finden sich auch in der Zellmembran von Herzmuskelzellen (Razandi et al. 2004).

Typischerweise erfolgt die Regulation der zellulären Östrogenrezeptorkonzentration zum einen auf transkriptioneller Ebene (Regulation der RNA-Produktion) und zum anderen durch Anlagerung von sog. Ubiquitinen, die eine konsekutive Zerstörung des angelagerten Rezeptors durch Proteasomen bedingen (Regulation auf Proteinebene) (Alarid et al. 1999; Wijayaratne, McDonnell 2001; Kinyamu et al. 2005).

Sowohl für den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  wie auch ER $\beta$  sind schnelle nichtgenomische Effekte bekannt.

#### **1.4 Egr-1 als Zielgen von Östrogen im Herzen**

Das frühe Wachstumsgen Egr-1 (early growth response gene 1) wurde erstmals von Milbrandt 1987 aus Rattenzellen isoliert und als ein durch NGF (nerve growth factor) induziertes Genprodukt (NGFI-A: nerve growth factor inducible gene A) beschrieben (Milbrandt 1987). Es entspricht den in der Folge nachgewiesenen Proteinen Krox-24 (Lemaire et al. 1988), zif/268 (Christy et al. 1988) und Egr-1 (Sukhatme et al. 1987).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Egr-1 durch verschiedenste Botenstoffe und Stimuli wie Stress, Verletzungen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren induziert wird.

Egr-1 nimmt als Transkriptionsfaktor in verschiedenen Zellsystemen einschließlich des kardiovaskulären Systems wichtige Regulationsaufgaben wahr.

Im Tiermodell geht bei atherosklerotischen Gefäßläsionen eine vermehrte Egr-1-Expression mit einer Steigerung einer Egr-1-induzierten Genexpression wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), PDGF-A (platelet-derived growth factor- $\alpha$ ), TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) sowie SOD1

(superoxide dismutase 1) einher, wodurch eine Mitwirkung von Egr-1 bei den Reparaturmechanismen nach Gefäßverletzungen abgeleitet wird (McCaffrey et al. 2000).

Offenbar spielt Egr-1 allgemein eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation durch Interaktion mit Apoptosegenen wie p53 (Liu et al. 1998; Krones-Herzig et al. 2003) und weist nach neueren Untersuchungen ein antikarzinogenes Potential auf, da ein Egr-1-Verlust mit einer Tumorgenese einhergeht (Huang et al. 1997).

Egr-1 spielt als frühes Regulationsprotein in der Signalkaskade der Herzhypertrophie eine Rolle, hier finden sich deutlich erhöhte Proteinlevel von Egr-1 (Saadane et al. 1999). Das Fehlen von Egr-1 im Rahmen von knockout-Experimenten bewirkt eine Veränderung der Genexpression im Rahmen der pathophysiologischen Antwort auf induzierte Hypertrophie (Saadane et al. 2000).

Da eine Induktion myokardialer kontraktile Proteine durch Egr-1 nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass neben einer schnellen Reaktion durch Egr-1 auch grundlegende Veränderungen des Genexpressionsmusters vermittelt werden (Gupta et al. 1991).

Unsere Arbeitsgruppe konnte übereinstimmend mit anderen Forschungseinrichtungen neben einer schnellen Induktion durch hypertrophe Stimuli wie Adrenozeptoren auch eine schnelle östrogenabhängige Egr-1-Expression zeigen.

Der Egr-1-Promotor mit 1,2 kb Länge enthält sowohl serumresponsive Elemente wie auch klassische östrogenresponsive Elemente sowie AP-1-Bindungsstellen für eine mögliche Östrogeninteraktion, so dass eine detaillierte Studie der östrogenabhängigen Promotoraktivierung durchgeführt wurde.

### **1.5 Zellkulturmodelle vom Herzen**

Bei der Untersuchung von Genprodukten (= Proteinen) im Herzen auf ihre Bedeutung und Funktion ist man häufig auf Tiermodelle angewiesen. Neben der Blockade des für das Protein kodierenden Gens mittels sog. „knock-out“-Tiere besteht die Möglichkeit, ein Protein durch das Einbringen des Gens mit einem starken viralen Promotor zu überexprimieren (sog. transgenes Tier).



Da bei beiden Methoden alle Zellen eines Organs von der Genveränderung betroffen sind, erhofft man sich dabei entweder eine Veränderung des Phänotyps (z.B. Herzhypertrophie) oder Veränderungen mit einem messbaren Korrelat (z.B. Blutdruckänderung).

Beide Verfahren sind mit einem enorm hohen technischen und finanziellen Aufwand bei der Herstellung der Tiere verbunden. Wesentlich günstiger und schneller ist das Einbringen der gewünschten Gene in Herzmuskelzellen in der Zellkultur.

Bei den etablierten Kardiomyozytenkulturen unterscheidet man zwischen neonatalen (ca. 2-3 Tage alte Herzen) und adulten Herzmuskelzellen. Beide Zellarten weisen als gemeinsames Merkmal aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrades die Teilungsunfähigkeit auf (Anversa, Kajstura 1998).

Die Vorteile neonataler Zellkulturen gegenüber adulten bestehen in der wesentlich längeren Lebensdauer (neonatale Herzmuskelzellen überleben unter geeigneten Bedingungen mehrere Wochen, adulte nur wenige Tage) sowie in der einfacheren und ergiebigeren Präparation.

## **1.6 Gentransfer-Methoden**

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryote Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Damit ist es möglich, die Expression von Genen und ihre Wirkungen auf Zellebene zu untersuchen.

Der DNA-Transfer in Zellen kann grundsätzlich auf zwei Arten geschehen:

Auf der einen Seite gibt es die sog. transiente Transfektion, bei der die transfizierte Erbinformation nicht in das Zellgenom eingebaut wird, sondern nur "vorübergehend" abgelesen und exprimiert wird, die andere Möglichkeit stellt die sog. stabile Transfektion dar, bei der das Zielgen fest in die Zell-DNA integriert und dauerhaft exprimiert wird.

Um bei der letztgenannten Methode die Zellen zu selektieren, die die Fremd-DNA stabil exprimieren, verwendet man Selektionsmedium, in dem nur stabil transfizierte Zellen überleben und weitergezüchtet werden können. Dieser Umstand erklärt auch die Notwendigkeit einer zur Zellteilung befähigten Zellkultur, da nur damit eine

ausreichende Selektion über mehrere Zell-Generationen möglich ist (Watson et al. 1993).

Die heute üblichen Zellkulturen von Herzmuskelzellen sind nicht mehr teilungsfähig, was also eine stabile Transfektion unmöglich macht.

Generell kann man die verschiedenen Techniken der Transfektion in zwei große Gruppen einteilen: zum einen alle Transfektionstechniken, die nicht auf virale Partikel angewiesen sind (nichtvirale Transfektion), zum anderen die Gruppe der viralen Transfektion, die sich der verschiedenen DNA- und RNA-Viren bedient.

Die Frage nach einem effizienten Gentransfer in Herzmuskelzellen ist sowohl für molekulargenetische Untersuchungen in der Zellkultur als auch für eine zukünftige Gentherapie am Herzen bedeutsam.

#### 1.6.1 Nichtvirale Transfektionsmethoden von Kardiomyozyten

Das Ziel jeder Transfektion, nämlich das Einbringen fremder DNA in die Herzmuskelzellen, wird durch mehrere Faktoren erschwert: zum einen bildet die Zellmembran das erste natürliche Hindernis, da die DNA aufgrund ihrer negativen Nettoladung als polares Molekül nicht durch die Membran diffundieren kann und aufgrund ihrer Größe auch nicht über spezifische Rezeptoren aufgenommen wird, wie dies zum Beispiel mit Oligonukleotiden möglich ist (Plank et al. 1998; Fattal, Barratt 2009).

Nach Überwinden dieser Barriere mittels Endozytose droht einem Großteil der nun intrazellulären endosomalen Partikeln die Zerstörung durch Lysosomen (Lechardeur et al. 2005). Der geringere Anteil noch intakter Plasmidpartikel muss anschließend vom Zytoplasma über spezielle Transportkanäle in den Zellkern gelangen (Lechardeur, Lukacs 2006), um dort von der Transkriptionsmaschinerie abgelesen werden zu können (van der Aa et al. 2006).

Für eine stabile Transfektion ist darüber hinaus ein permanenter Einbau in das Genom der Zelle nötig, was nur etwa mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 1:10.000 eintritt.

Während proliferierende Zellarten mit noch bestehender Teilungsfähigkeit eine relativ ausgeprägte Transportaktivität und nukleäre Aufnahmekapazität von Plasmid-DNA aufweisen, zeigt sich bei ausdifferenzierten Zellarten ohne bestehende Teilungsfähigkeit (wie adulte Kardiomyozyten) dagegen eine deutlich geringere Aktivität (Feldherr, Akin 1993). Daneben spielt die Größe der eingebrachten Plasmide eine Rolle, da eine DNA-Größe über 250 Basenpaare zu einer zunehmenden intrazellulären Immobilität führt und damit die Translokation zum Zellkern erschwert (Lukacs et al. 2000).

Zur Überwindung der Zellmembran wurden seit dem Beginn der Transfektionsexperimente in den 70iger Jahren verschiedene Techniken entwickelt, die entweder auf rezeptorvermittelter Endozytose, Phagozytose oder Verschmelzung mit der Zellmembran beruhen. Daneben existieren mechanische Einbringungsmethoden wie Elektroporation (Shigekawa, Dower 1988) oder Mikroinjektion (Capecchi 1980), die aber keinen effizienten Gentransfer unter normalen Laborbedingungen erlauben.

Die Etablierung der sogenannten Liposomentransfektion, bei der durch die Bildung von DNA-Liposomkomplexen (von einer Doppellipidschicht umgebene Plasmid-DNA durch Vesikelbildung in wässriger Lösung) eine Zellmembranfusion mit anschließender DNA-Freigabe in das Zellinnere erfolgt (Sternberg et al. 1994), bot eine technisch einfache Möglichkeit zur Zelltransfektion (Transfektion mit sog. „Zytokineten“).

Eine weitere Transfektionsmethode stellt die Kopplung der Plasmid-DNA an körpereigene Proteine dar, die eine rezeptorvermittelte Endozytose hervorruft, ein Verfahren, das bei der Transferrin-gekoppelten Transfektion an bestimmten Zellsystemen erfolgreich einsetzbar ist (Wagner et al. 1990).

Leider weisen alle bisher entwickelten Methoden an Kardiomyozyten eine sehr geringe Transfektionseffizienz auf (Antin et al. 1988) und sind daher mit Einschränkungen für *in-vivo*-Experimente aber keinesfalls für eine klinische Anwendung geeignet.

### 1.6.2 Viral gestützte Transfektionsmethoden an Kardiomyozyten

Mit der Einführung replikationsdefizienter rekombinanter Adenoviren eröffneten sich neue Möglichkeiten der Genforschung durch die dadurch ermöglichte effiziente Transfektion von Plasmid-DNA in Zellsysteme mit bislang erschwerter Transfektionssituation (Schneider, French 1993) und erste Überlegungen zu einer Gentherapie erkrankter myokardialer Zellsysteme (Alexander et al. 1999).

Bei der klassischen viralen Transfektion wird das einzubringende Plasmid in das Virusgenom integriert und über die Aufnahme des Virus (Zellinfektion) in die Zelle transportiert (Technik der viralen Vektoren).

Der Vorteil dieses Systems besteht in der hohen Effizienz und nach erfolgreicher, technisch und zeitlich allerdings sehr aufwendiger Herstellung der viralen Vektoren in einer transfektionstechnisch einfachen Handhabung.

Ein alternatives Verfahren beruht auf dem Prinzip, die zu transfizierende DNA nur vorübergehend mittels eines Trägerstoffes an das Virus zu koppeln. Hierbei nutzt man die negative Nettoladung der DNA-Plasmide, die über die Bindung an ein positiv geladenes Protein an das negativ geladene Virus gebunden werden kann (Curiel et al. 1992).

In der Folgezeit wurden neue Konjugationsmethoden entwickelt, die in unterschiedlicher Weise Adenovirus, Polylysin-DNA und Rezeptorliganden verbinden (Fisher, Wilson 1994; Baker et al. 1997).

Dieses System weist zwar eine im Vergleich zu den stabilen Vektoren deutlich geringere Effizienz auf, stellt aber eine elegante Transfektionsmethode dar, wenn eine große Menge verschiedener Plasmide transfiziert werden müssen, da die langwierige und sehr zeitaufwendige Virusherstellung für jedes einzelne zu transfizierende Plasmid entfällt.

## 2 Fragestellung

Um den Mechanismus der Östrogenwirkung auf zellulärer Ebene in Herzmuskelzellen besser verstehen zu können, standen die folgenden Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit im Vordergrund:

1. *Mit welcher Methode lässt sich ein Gentransfer von variablen Plasmiden in Herzmuskelzellen effektiv realisieren?*

Hierzu wurden nichtvirale Transfektionsmethoden mit der adenoviral gestützten Transfektion von Kardiomyozyten verglichen und optimiert.

2. *Wie erfolgt die Genregulation durch Östrogen an Herzmuskelzellen?*

Das frühe Wachstumsgen Egr-1 (Early growth response gene 1) weist eine östrogenabhängige Induktion in Kardiomyozyten auf, wie unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte. Anhand dieses Gens erfolgte eine Promotorstudie mit Untersuchung der Östrogenwirkung in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowie eine Untersuchung weiterer Transkriptionsfaktoren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Plasmide

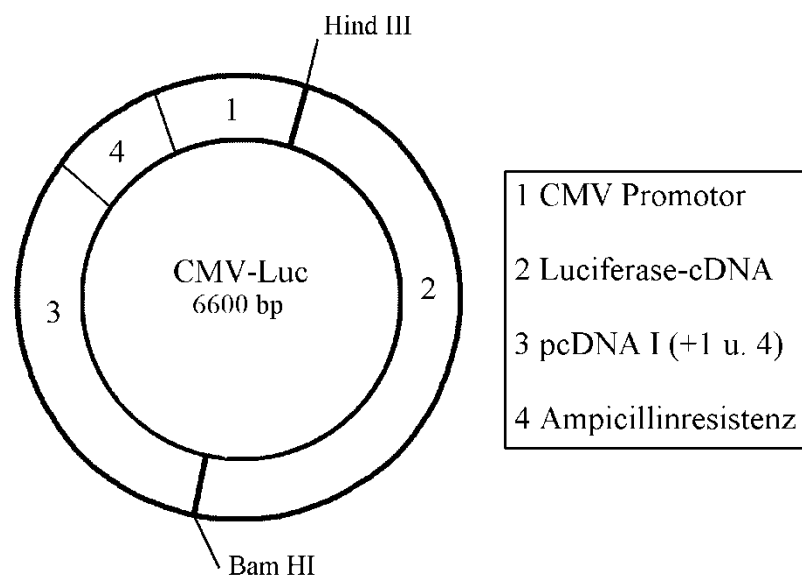
#### 3.1.1 Beschreibung der verwendeten Plasmide

##### pCMV-Lac F:

Das pCMV-Lac F Plasmid besteht aus einem pUC18 Grundgerüst der Fa. Boehringer Mannheim, das eine Ampicillin-Resistenz enthält (Yanisch-Perron et al. 1985). An einer „multiple cloning site“ wurde der CMV-IE-Promoter zwischen einer Xba- und einer Xba I-Restriktionsstelle sowie das LacZ-Gen zwischen einer Sal I- und Sac I-Stelle inkloniert.

p-CMV-Luciferase:

Das pCMV-Luciferase-Plasmid besteht aus einem pcDNA 1.1 /Amp(500)-Grundgerüst der Fa. Invitrogen, das eine Ampicillinresistenz und einen CMV-IE-Promotor (CMV-immediate-early-Promotor) enthält. Die Luciferase-cDNA ist zwischen die Schnittstellen Bam HI und Hind III einkloniert.



**Abb. 3.1-1: Schema des CMV-luc-Plasmids**

Das 6,6 kb große CMV-luc-Plasmid enthält neben der Luciferase codierenden cDNA (2), die von einem CMV-Promotor (1) initiiert wird, eine Ampicillinresistenz. Einkloniert wurde CMV-luc in ein pcDNA-Gerüst von Invitrogen.

Egr-1-Luciferase (Egr-1-luc), Deletionsmutanten des Egr-1-Promotors und ERE-luc

Die im 5'-Bereich anhängende Promotorregion (1,2 kb) des Zinkfingerproteins Egr-1 ist unter der Zugangsnummer X12617 in der GenBank™ hinterlegt (Tsai-Morris et al. 1988).

Alle Deletionsmutanten des Egr-1-Promotors (Konstrukte A-D) sowie ERE-Luciferase sind an einer *SalI*-site in einen pXP-2-Luciferase-Vektor der Fa. Invitrogen einkloniert.

Die Deletionsmutanten des Egr-1-Promotors wurden uns freundlicherweise von V. Sukhatme zur Verfügung gestellt (Alexandropoulos et al. 1992).

#### pSG-HEO RSV-ER $\alpha$ und CMV-ER $\beta$ :

Die cDNA von Östrogenrezeptor ER $\alpha$  unter dem RSV-Promotor befindet sich in einem pSG-HEO-Vektor. Der Östrogenrezeptor ER $\beta$  wird durch einen CMV-Promotor ebenfalls in einem PSG-HEO-Vektor kontrolliert.

### 3.1.2 Kompetente Zellen und Transformation

Eine weit verbreitete Methode, eukaryote DNA, besonders in Form von Plasmiden, zu vermehren, ist es, die DNA in Bakterien einzubringen (Transformation), sie dort vermehren zu lassen und anschließend wieder aus den Bakterien zu isolieren. Um die Bakterien dazu jedoch nutzen zu können, müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein.

Zum einen müssen die Bakterien die Fähigkeit besitzen, die DNA aufzunehmen und sie zu replizieren, ohne sie dabei in das bakterielle Genom einzubauen. Die DNA muss ein Resistenzgen beinhalten, damit die Bakterien selektioniert werden können, die die DNA auch tatsächlich aufgenommen haben.

Das Genprodukt der DNA wiederum darf keine zu große toxische Wirkung entfalten, da sonst alle Bakterien zugrunde gehen.

#### **Herstellung kompetenter Bakterien**

Zu Beginn steht die Aufgabe, die Bakterien zur Aufnahme der DNA zu befähigen („kompetent“ zu machen). Dazu werden Bakterienarten wie E.coli verwendet, die schon von Natur aus die Möglichkeit besitzen, fremde DNA aufzunehmen. Durch eine Behandlung mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung wird die Bakterienwand dünner und so die DNA-Aufnahme zusätzlich erleichtert.

E.coli-Bakterien vom Typ DH 5 wurden mit einer ausgeglühten Öse in ein steriles 12 ml-Tube mit 5 ml sterilisiertem Bakterienmedium (LB-Medium) eingebracht und 1-2 h

bei 37°C geschüttelt, bis eine sichtbare Trübung als Zeichen einer relevanten Vermehrung eingetreten war. Diese Vorkultur wurde nun in einen 500 ml fassenden Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium überführt und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD 590 von ungefähr 0,4 (optische Dichte bei 590 nm) inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD wurde die Bakterienlösung auf zehn 50 ml-Tubes aufgeteilt und für 20 min auf Eis gestellt. Nach einem anschließenden Zentrifugieren mit 600 g bei 4°C für 7 min wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das verbleibende Bakterien-Pellet wurde mit 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation auf Eis bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

### **Transformation**

Die Transformation wurde stets an E.coli-Bakterien mit Plasmid-DNA, die ein Ampicillin-Resistenzgen enthielt, vorgenommen.

Dazu wurden zunächst 50 µl von kompetenten E.coli DH5 in ein auf Eis vorgekühltes 15 ml-Tube mit 10-100 ng Plasmid-DNA gegeben und nach gründlichem Mischen für 30 min auf Eis belassen. Danach wurden die Zellen in einem 42°C-Wasserbad für 45 sec einem „Hitzeschock“ ausgesetzt und nach Zugabe von 1-2 ml LB-Medium auf einem Schüttler bei maximaler Geschwindigkeit (250 U/min) und 37°C 1-2 Stunden wachsen gelassen.

#### **3.1.3 Anzüchtung der Bakterien und Aufreinigung des Plasmids**

Von der wie oben beschriebenen transformierten E. coli-Suspension (Punkt 4.1.2) wurden 1-2 ml zu 500 ml LB-Medium mit 50 mg/ml Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C und maximaler Umdrehung auf einem Bakterien-Shaker wachsen gelassen. Die weitere Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll für Maxipreps von Quiagen.



### 3.1.4 Quantifizierung und Identifizierung der Plasmide

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde in einem Photometer quantifiziert, wobei 1 µl DNA mit 49 µl H<sub>2</sub>O vermischt und die Exstinktion bei 260 nm gegen eine Leerprobe gemessen wurde. Hierbei entspricht die optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, während bei einzelsträngiger DNA eine Konzentration von 33 µg/ml vorliegt.

Plasmide enthalten Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren, die für eine Restriktionsendonuklease spezifisch sind. Restriktionsendonukleasen sind ursprünglich bakterielle Enzyme zur Spaltung fremder doppelsträngiger DNA (Nathans 1979). Die aufgespaltenen Fragmente können dann neben einem Marker, dessen Fragmente bekannt sind, in einem Agarosegel aufgetrennt und identifiziert werden.

Es wurden 1 µg DNA mit je 5 Units des Restriktionsenzym in einem geeigneten Restriktionspuffer für 3 h bei 37°C inkubiert und danach die Enzyme für 10 min bei 70°C inaktiviert.

Nach Zugabe eines Agarosegel-Puffers, der das Herausdiffundieren der Probe aus der Tasche verhindert, wurde die DNA bei 70 Volt Gleichstrom in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch das dem Agarosegel zugesetzte Ethidiumbromid, können unter einer UV-Lampe DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden. Durch Vergleichen des spezifischen Bandenmusters mit einer Plasmidkarte kann das Plasmid sicher identifiziert werden.

## 3.2 *Adenovirus*

### 3.2.1 Verwendeter Leervektor

Zu allen Experimenten wurde ein Adenovirus 5 RR5 verwendet, der zur Subgruppe C der Adenoviren gehört und nicht onkogen ist (Gluzman Y 1985). Dieser Adenovirustyp ist 33047 bp lang und weist eine E1A- (445-3333 bp) und eine E3- (28200-30300 bp) Deletion auf. Die E1A-Deletion ist die Ursache für seine Replikationsdefizienz (Poller et al).

### 3.2.2 Präparation und Purifikation

Alle Versuche mit Adenoviren wurden in einem S2-Labor (Sicherheitsstufe 2) durchgeführt.

Die bei Transfektionsexperimenten üblichen replikationsdefizienten Viren weisen in ihrem Genom eine Deletion von E1 und eine Teildeletion im E3-Gen auf und können sich deshalb nur in einer speziell transformierten Zelllinie vermehren, sogenannten HEK-Zellen (siehe Material und Methoden 3.3.1), die die für die Replikation wichtigen fehlenden viralen DNA-Abschnitte komplettieren (Graham et al. 1977).

Zunächst wurde eine geringe Menge Adenoviren, in der Größenordnung von  $2 \cdot 10^5$  Partikel, bei einer Zielkonzentration von etwa 1 bis 10 PFU (Plaque forming Units), auf einer ca. 80% konfluenten 12 cm-Petrischale mit HEK 293 gegeben und bei 37°C mit Medium ohne Serum inkubiert. Nach 30 min (entspricht etwa der Aufnahmezeit der Viren in die Zellen) wurde mit Medium (5% Horseserum) aufgefüllt und so lange inkubiert, bis die meisten Zellen aufgrund der Vervielfältigung der Viren eine runde Form angenommen hatten.

Die Zellen wurden dann mit einem Zell-scraper von der Schale abgelöst und zusammen mit dem Medium in Zentrifugenflaschen überführt. Nach der Zugabe von NP-40 auf eine Konzentration von 0,5% erfolgte eine kurze Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Danach wurden die Zellen bei 11.000 upm (= 19700g) mit einem GSA Rotor für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die vermehrten Adenoviren, die nun weiter aufgereinigt werden mussten.

Die weitere Aufreinigung der Adenoviren erfolgte nach dem implementierten LacZ-Gen.

Nach Zugabe von 0,5 Volumen 20% PEG 8000 und 2,5M NaCl (Endkonzentration 6,6% PEG 8000 / 1M NaCl) wurde der die Adenoviren enthaltende Überstand für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde das Virus durch Zentrifugieren bei 11.000 upm und 4°C für 15 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 8 ml PBS gelöst und mit CsCl auf eine Dichte von 1,34 g/ml eingestellt. Die Lösung wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit CsCl-Lösung (1,34 g/ml in 10 mM Tris-Puffer) auf gleiches Gewicht aufgefüllt. Nach dem Versiegeln der Röhrchen wurde in einer Ultrazentrifuge für 3 h bei 90.000 upm und 20° C zentrifugiert. Die Röhrchen

wurden dann vorsichtig aus dem Rotor genommen, an der Spitze mit einer Nadel (25 Gage) belüftet und dann die untere der beiden milchigen Banden ebenfalls mit einer 25G-Nadel abgezogen. Hierbei entsprach die obere Bande den leeren, die untere den intakten Viruspartikeln. Eine mit TBS äquilibrierte Sephadex G-25-Säule wurde zur Entsalzung des CsCl aus der Viruslösung verwendet.

Die virushaltigen Eluatfraktionen wurden photometrisch identifiziert und durch Zugabe von BSA auf eine 0,1%ige Lösung aliquotiert.

### 3.2.3 Quantifizierung der Adenoviruspräparation

Zur Quantifizierung der Adenoviruspartikel wurde die Adenoviruslösung bei 260 nm im Photometer gemessen. Hierbei entspricht einer Absorptionseinheit eine virale Partikelmenge von  $10^{12}$  pro ml Suspension (Curiel et al. 1991).

## 3.3 Zellkulturen

### 3.3.1 HEK 293

Diese Zell-Linie stammt von humanen embryonalen Nierenzellen ab und stellt eine immortalisierte Krebslinie dar, die sich aufgrund guter Transfizierbarkeit sehr gut für Transfektionsexperimente nutzen lässt. Daneben werden diese Zellen zur Replikation und Züchtung von replikationsdefizienten Adenoviren benutzt.

Die HEK 293-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion mit ca. 20000 Zellen pro Well eines 24er Wells ausplattiert, so dass am Tag der Transfektion eine etwa 80-90%ige Konfluenz erreicht war. Das im Allgemeinen verwendete Medium war phenolrothaltiges Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) der Fa. Gibco mit 10% FCS (fetal calf serum), mit 100 IU/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin. Für Östrogenversuche wurde phenolrotfreies DMEM der Fa. Gibco mit 10% CPSR-1 verwendet, um unspezifische östrogenartige Wirkungen durch Phenolrot und Serumbestandteile zu vermeiden (Berthois et al. 1986).

### 3.3.2 Neonatale Kardiomyozyten

Zur Herstellung der Zellkultur von neonatalen Kardiomyozyten wurde im Wesentlichen nach dem Protokoll von Simpson und Savion vorgegangen (Simpson, Savion 1982).

Alle folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank ausgeführt.

Alle verwendeten Metallgeräte (Scheren, Skalpelle, Pinzetten) sowie alle Flaschen wurden am Tag zuvor in einem Autoklaven dampfsterilisiert.

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und sterilfiltriert.

Nach Desinfektion neonataler Ratten mit Braunol und anschließender Dekapitation wurde der Thorax eröffnet, das Herz aus dem Mediastinum entfernt und steril in ein Schälchen mit isoosmolarer Pufferlösung (CBFHH) mit Glukose und Antibiotikum (PCN und SM) gegeben. Zur Verhinderung von Koagulationen waren diesem Puffer 5000 IE Heparin zugesetzt.

Nach Sammlung aller Herzen wurde die Pufferlösung abgesaugt und durch frischen Puffer ersetzt. Nach einem weiteren Waschvorgang und Absaugen des Puffers wurden die Herzen mit sterilen Skalpellen zerkleinert. Die Herzstücke wurden nun mit ca. 10-20 ml jetzt Trypsin und DNase enthaltenden Pufferlösung (sog. „Verdaulösung“ = T&D-Lösung) resuspendiert und in ein 50 ml-Falcon-Tube mit einem sterilen Rührfisch überführt.

Nach gründlichem mehrmaligem Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren wurde das Falcon-Tube für 20 min bei RT auf einem Magnetrührer mit langsamster Stufe durchmischt. Alle nun folgenden Schritte dienten dem „Verdau“ des Herzen, um am Ende eine Zellsuspension aus Einzelzellen zu erhalten.

Nach erneutem Durchmischen wurde die Suspension für ca. 3 min stehen gelassen, so dass sich eine wässrige obere und eine feste untere Phase bildete: in der oberen Phase befand sich die T&D-Lösung mit Einzelzellen, während in der unteren Phase noch ganze Zellverbände und Bindegewebszüge zu finden waren. Die obere Phase wurde nun vorsichtig abpipettiert und verworfen; das fehlende Volumen wurde mit einer entsprechenden Menge T&D-Lösung wieder auf ein Gesamtvolumen von ca. 20 ml aufgefüllt. Das Falcon-Tube wurde nun wieder für 20 min auf den Magnetrührer gestellt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Im folgenden betrug die Durchmischungszeit auf dem Magnetrührer statt 20 min nur noch 5 min, außerdem wurde der Überstand nicht mehr verworfen, sondern in ein weiteres Falcon-Tube überführt, das zur Hemmung des Trypsins und der DNase 7,5 ml fötales Kälberserum (FCS) enthielt. Dieser Vorgang wurde in gleicher Weise fortgeführt.

Zur Kontrolle wurden von dem abpipettierten Überstand, der die Herzmuskelzellen enthalten sollte, jeweils ein Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop auf die Anzahl an Herzmuskelzellen hin untersucht. Dabei wurden Kardiomyozyten, die sich durch eine schmale, längliche Gestalt ausweisen, von Nicht-Herzmuskelzellen (kleinere, eher runde Formen) differenziert. Der Verdauvorgang wurde beendet, wenn auf dem Objektträger kaum noch Herzmuskelzellen zu finden waren.

Nun wurden alle Falcon-Tubes bei 300 g für 10 min bei 27°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das zellhaltige Pellet mit 5% FCS-haltigem Medium resuspendiert und gründlich durchmischt. Die Suspension wurde daraufhin durch einen „cell-strainer“ (Zellsieb) auf eine 10 cm-Petrischale gegeben und für ein bis zwei Stunden in einem 1% CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C vorinkubiert (sog. „preplating“). Dieser Schritt diente der weiteren Aufreinigung der Kardiomyozyten, wobei man sich hierbei den Umstand zunutze macht, dass Nicht-Herzmuskelzellen (insbesondere Fibroblasten) schneller an der Zellkulturschale anhaften als Kardiomyozyten, so dass nach dieser Inkubationszeit fast nur noch Herzmuskelzellen in Lösung sind.

Das Medium mit den Herzmuskelzellen wurde von den Petrischalen abgenommen und in 50 ml Falcon-Tubes mit MEM 5 gesammelt. Bereits leicht angeheftete Kardiomyozyten wurden durch leichtes Klopfen vom Boden der Petrischale gelöst und mit etwas MEM 5 gespült und ebenfalls in das Falcon-Tube übernommen.

Nach gründlichem Mischen wurde die Zellzahl pro Milliliter in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt: dazu wurden in ein Eppendorf-Cap zu 400 µl PBS mit 50 µl Trypanblau 50 µl der Zellsuspension gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt; die Zellzahl wurde je nach Anzahl der ausgezählten Felder berechnet.

Die Zellen wurden nun in entsprechender Dichte auf die 12er- bzw. 24er Wells ausplattiert, mit MEM 5 versehen und für 24 h im Brutschrank belassen.

Am nächsten Tag wurde nach einmaligem Waschen mit PBS das Medium durch serumfreies Medium (MEM/1I) ausgetauscht. Die Transfektionen fanden am folgenden Tag statt.

### **3.4 Nicht-virale Transfektionen**

Die nicht-viralen Transfektionen wurden ebenso wie die viralen stets unter sterilen Zellkulturbedingungen durchgeführt.

Für alle Östrogen-Experimente wurde östrogenfreies Medium ohne Phenolrot mit 5% CPSR-1 verwendet.

Die Versuche zur Transfektionsverbesserung mit CMV-luc oder CMV-lacZ wurden in phenolrothaltigem Medium mit 5% FCS durchgeführt.

#### 3.4.1 Calcium-Phosphat

In ein 1,5 ml Eppendorf-Cap wurde zunächst eine 1x-HBS-Pufferlösung in einem Volumen von 15 µl pro Transfektionsansatz für ein 24er Well, bestehend aus 13,29 µl transfection qualified water mit 1,5 µl HBS-Lösung und 0,225 µl NaOH-Lösung, angesetzt. Anschließend wurden 0,30 µl Phosphat-Lösung hinzupipettiert und durch Erzeugen von Sauerstoffbläschen mittels einer großlumigen Pipette vorsichtig durchmischt.

In ein weiteres Eppendorf-Cap wurde in der Zwischenzeit die Plasmid-DNA zusammen mit der Carrier-DNA, maximale Gesamt-DNA-Menge 0,6 µg, in transfection qualified water vermischt (bei einem Gesamtvolumen von 13 µl). Hinzu kamen unter behutsamem Mischen zunächst 0,30 µl Calcium-Lösung, anschließend weitere 1,5 µl. Nun wurde tröpfchenweise unter weiterem Mischen und „bubbling“ der Inhalt des Caps 2 (Cap mit der Plasmid-DNA) in das Cap mit dem Phosphatpuffer gegeben und sorgfältig und vorsichtig vermischt. Innerhalb weniger Minuten trat eine deutliche Trübung der Lösung ein, die die Bildung von Calcium-Phosphat-DNA-Komplexen anzeigte. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT erfolgte das langsame, tröpfchenweise Einbringen des Gemisches unter leichtem Schwenken des Zellkulturmediums in die Zellkulturschale. Die Zellen wurden für 10 bis 24 h in ihrem

Transfektionsmedium, das kein Serum enthält, belassen und nach vorsichtigem Waschen mit PBS mit frischem DMEM mit 5% CPSR-1 versehen.

### 3.4.2 SuperFect

Diese Transfektionstechnik bewährte sich besonders gut an humanen Nierenembryonalzellen (HEK 293), die in der Literatur als östrogenrezeptorfrei beschrieben sind (Barkhem et al. 1998).

Die Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von 0,2 Mio. pro Well auf einem 24er Well mit 10% FCS-haltigem DMEM mit Phenolrot ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in der Regel bei einer Konfluenz von ca. 80% transfiziert.

Dazu wurde zunächst 1 µg der zu transfizierenden DNA in ein Eppendorf-Cap pipettiert und mit serum- und antibiotikumfreien Medium auf ein Volumen von 60 µl aufgefüllt. Hierzu wurden 5 µl SuperFect gegeben und nach vorsichtigem Mischen 5-10 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe von 350 µl serum- und antibiotikumfreiem Mediums wurde das Gemisch nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS auf die Schalen gegeben. Nach drei Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem, nun mit Antibiotika- und 5% CPSR-1-haltigen Medium versehen.

Die Auswertung erfolgte mittels Luciferase-Assay nach 24 Stunden Inkubation.

### 3.4.3 LipofectAMIN PLUS™

Kardiomyozyten wurden bei ca. 70-80%iger Konfluenz transfiziert. Von der zu transfizierenden DNA wurden für die Transfektion eines 24er Wells zwischen 0,5 und 3 µg in 25 µl serum- und antibiotikumfreiem Transfektionsmedium (OptiMEM zu MEM im Verhältnis 4:1) zusammen mit 1-5 µl PLUS-Reagenz aufgelöst und 15 min bei RT inkubiert. Dazu wurden 1-5 µl Lipofektamin in 25 µl Transfektionsmedium hinzugegeben und weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 200 µl Transfektionsmedium wurde die Suspension auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und für 3 h bei 37°C in einem 1% CO<sub>2</sub>-haltigen Inkubator belassen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit normalem 5%

CPSR-1-haltigen Medium versehen und für 24 h bei 37°C und 1%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die Auswertung mittels Luciferase-Assay oder β-Gal-Färbung erfolgte nach 24-48 h.

### **3.5 *Viral unterstützte Transfektion – Komponentensystem***

Das Prinzip dieser Transfektionsmethode beruht zum einen auf der Fähigkeit von Adenoviren, sich spezifisch an zelluläre Rezeptoren zu binden und anschließend endozytiert zu werden, zum anderen auf der Möglichkeit, negativ geladene DNA mit Hilfe eines positiv geladenen Proteins an die negative Matrixstruktur von Viren zu koppeln.

Für Transfektionen der Kardiomyozyten wurden replikationsdefiziente Adenoviren vom Typ RR5 (Add-RR5) verwendet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Poller freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Diese nicht vermehrungsfähigen Viren weisen eine komplette Deletion der E1-Region und Teildeletionen in der E3-Region auf.

Die Transfektionen wurden nach folgendem Grundschema durchgeführt:

Für die Transfektion von 2 Wells eines 12er Wells wurde im ersten Schritt auf ein Gesamtvolumen von 500 µl Medium (Mischung aus MEM/T und OptiMEM im Verhältnis 4:1) Adenoviren in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{10}$  Partikel/ml hinzugegeben und der erste Teil Poly-L-Lysin (*MW 30000-70000 Da*) mit einer Zielkonzentration von 2,73 µg/ml dazugegeben und durch Herunterspinnen in einer Eppendorf Tischzentrifuge gemischt. Nach einer 50-minütigen Inkubationszeit bei RT wurde die zu transfizierende DNA in einer Gesamtkonzentration von 0,91 µg/ml dazu pipettiert. Nach erneutem Herunterspinnen erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde der zweite Teil Polylysin hinzugegeben, so dass eine Gesamtkonzentration von 2 µg/ml entstand, nach weiteren 10 min RT schließlich mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 1ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS auf zwei Wells mit einem Volumen von je 500 µl gegeben. Die Zellen wurden daraufhin wieder je nach Mediumart in einem 5%- oder 1%-CO<sub>2</sub>-haltigen 37°C-Inkubator für 3 Stunden in dem Transfektionsmedium belassen. Danach wurde das Medium abgesaugt und nach



einmaligem Waschen mit PBS durch Medium mit 5% CPSR-1 und spezifischen Mediumzusätzen wie z.B. Östrogen oder ICI 182780 ersetzt.

Die Auswertung erfolgte nach weiteren 21 Stunden mit der im Folgenden beschriebenen Luciferasemessung mit dem Luciferase-Assay-Kit von Promega bzw. durch Anfärben der transfizierten Zellen mit dem  $\beta$ -Gal-System.

Zur Transfektion von 2 Wells eines 24er Wells wurden die gleichen Verhältnisse benutzt, der Umrechnungsfaktor betrug dabei 0,63.

### **3.6 Nachweismethoden**

#### 3.6.1 Luciferase Assay

Das Luciferaseenzym entstammt dem Leuchtorgan des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) und katalysiert die aufgeführte Reaktion unter Bildung von Licht:



Nach der Transfektion der Zellen wird die Aktivität des Luciferaseenzym im Zell-Lysat mit einem hochempfindlichen Lichtmessgerät (Luminometer) gemessen. Mittels dieser Messmethode ist eine sehr genaue Quantifizierung der Transfektion (de Wet et al. 1987; Nguyen et al. 1988; Alam, Cook 1990) möglich.

Nach der Gesamtkubationsdauer von 24h bei 37°C wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und anschließend unsteril lysiert. Dazu wurden zunächst alle Wells mit 85  $\mu$ l pro 24er Well 1x-Lysis-Puffer der Firma Boehringer Mannheim für 3 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Wells mit einem Zell-scraper abgekratzt und in 0,5 ml-Eppendorf-Caps pipettiert. Diese wurden dann bei RT 6 min bei 6000 upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Das nun in Überstand und Pellet aufgetrennte Zell-Lysat enthielt im Überstand das zu messende Luciferase-Enzym, während sich im Pellet die Membranbestandteile und Kernbestandteile befinden sollten. Aus dem Überstand wurden 20  $\mu$ l in ein

Eppendorf-Zentrifugenröhrchen übernommen. Zur Messung wurden zu jedem Röhrchen 100 µl Luciferase-Assay der Fa. Boehringer Mannheim hinzugegeben und im Luminometer nach Angaben des Herstellers gemessen. Ein Messvorgang beinhaltete jeweils eine zweimalige Messung über 30 sec Die Dauer der Aktivität des Luciferase-Enzyms in Verbindung mit dem Luciferase-Assay wird vom Hersteller mit über 5 min angegeben, so dass die jeweilige Messung beendet wurde, wenn die Werte über mehr als 20 sec konstant blieben oder, wie im Regelfall, kontinuierlich absanken. Die Aktivität des Luciferase-Enzyms wurde mit der Einheit „Relative Lichteinheiten pro Minute“ (RLU/min) angegeben. Als Messwert für die weitere Auswertung wurde der jeweils höchste eines Messintervalls verwendet.

Zur besseren Vergleichbarkeit und um etwaige Schwankungen der Transfektion aufzufangen, wurden sämtliche Messwerte für die Auswertung mit dem Proteingehalt des Lysates korreliert, also in RLU/min pro µg Protein angegeben.

### 3.6.2 Beta-Galaktosidase-Färbung

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz der Zellen wurde das β-Galaktosidase-Färbeverfahren nach den *Current Protocols in Molecular Biology* 9.11.9 durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass sich alle diejenigen Zellen, die das zuvor transfizierte CMV-lacZ-Gen in ausreichender Menge exprimieren, sich bei Zugabe von β-Galaktosidase blau anfärben. Das LacZ-Gen entstammt E.coli-Zellen, das daraus entstehende Protein Galaktosidase dient der Spaltung von Galaktopyranosiden.

Die Zellen wurden nach 24 h sorgfältig mit PBS gewaschen und mit 0,05 %igem Glutaraldehyd bei RT für 3 min fixiert. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für weitere 20 min bei RT mit PBS inkubiert. Nach Absaugen des PBS wurde noch einmal mit PBS gewaschen und anschließend die Färbelösung, mit etwa 200 µl pro 24er-Well aufgebracht. Die Schale wurde anschließend wieder in den 37°C-Brutschrank verbracht und für 24 h inkubiert.

Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag unter dem Mikroskop.

Als erfolgreich transfiziert wurden diejenigen Zellen definiert, die eine deutliche Blaufärbung aufwiesen. Diese Zellzahl wurde durch die Gesamtzahl der

vorhandenen Herzmuskelzellen dividiert und so der Prozentsatz der transfizierten Zellen errechnet.

### 3.6.3 Proteinmessung nach der Bio-rad Methode

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Dye-Reagent-Kit der Fa. Boehringer-Mannheim. Zunächst wurden in Photometer-Küvetten zu 800 µl destilliertem H<sub>2</sub>O 200 µl Protein-Dye-Reagent der Fa. Boehringer-Mannheim pipettiert und sorgfältig vermischt. Aus dem Zell-Lysat, wie unter Punkt 2.3.1 (Methoden – Luciferase-Assay) beschrieben hergestellt, wurden nun 2 µl entnommen und ebenfalls in die Küvetten pipettiert und nach gründlichem Mischen mit Rührstäbchen 15 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Durchmischen der Probe wurde bei 595 nm im Photometer gegen eine Leerprobe gemessen. Die Eichkurve für das Photometer wurde mit einer BSA-Standardlösung erstellt.

### 3.6.4 Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Reinheit der Kardiomyozytenkultur und der Transfektionseffizienz

Petrischalen (Durchmesser 10 cm) wurden mit runden, angefeuchteten und sterilen 10mm Deckgläsern belegt, die nach dem Antrocknen mit Gelatin beschichtet wurden. Die Kardiomyozyten wurden wie beschrieben ausgesät und für 2 bis 3 Tage in Kultur gehalten. Nach dreimaliger Waschung mit PBS für jeweils 5 min wurden die Zellen in 2% Paraformaldehyd für 15 min bei RT fixiert. Danach wurde die Blockierungslösung (1%ige BSA, 0,5%iges Triton X100 in PBS) dazugegeben, wodurch eine Permeabilisierung der Membran für den Antikörper erfolgt.

Alle weiteren Schritte wurden mit Tween-20 0,15% als Zusatz in PBS durchgeführt. Die Deckgläser wurden jeweils in 24er Schalen überführt und dort nach Waschen mit PBS mit dem 1. Antikörper für eine Stunde inkubiert. Die optimale Verdünnung der Antikörper wurde in Dosis-Wirkungskurven für jeden Antikörper bestimmt. Nach dreimaliger Waschung mit PBS wurde der 2. Antikörper zusammen mit Phalloidin in einer 1:600 verdünnten und DAPI in einer 1:2000 verdünnten Lösung hinzugefügt und für eine weitere Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach

wurden die Deckgläser erneut dreimal mit PBS gewaschen und auf die Objektträger überführt, die mit einem kleinen Tropfen Mowiol bedeckt waren. Nach Fixierung der Deckgläser mit Nagellack an den Rändern erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand von Fotografien, da die Fluoreszenzfarbstoffe bei Betrachtung im Mikroskop sehr schnell verblassen.

### **3.7 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Um *in vitro* die Bindung von Proteinen an DNA-Stränge nachweisen zu können, wurden zelluläre Proteinextrakte mit radioaktiv markierten (gelabelten) DNA-Oligonukleotiden angesetzt und die entstehenden Komplexe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA/Proteinkomplexe wiesen abhängig von Größe und Ladung eine reduzierte Durchlaufgeschwindigkeit im Gel auf und wurden somit von den ungebundenen Oligonukleotiden abgetrennt (mobility **shift**).

Um unspezifische Bindung von Proteinen an die markierte Probe zu verhindern, wurden synthetische Oligonukleotide (poly-dI/dC) in großem Überschuss in Relation zur untersuchten Probe hinzugefügt. Der Nachweis einer spezifischen Bindung erfolgte durch Zugabe steigender Mengen nichtmarkierter Probe (5-100 ng).

#### 3.7.1 Gewinnung von nukleären Extrakten

Die mit unterschiedlichen Parametern behandelten Kardiomyozyten wurden nach mehrmaligem Waschen mit PBS und anschließendem Abschrapen in Eppendorf-Caps übernommen und in einer Mikrozentrifuge für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Pellet mit 400 µl Puffer A resuspendiert und nach 15minütiger Eiskühlung mehrmals durch eine Insulinspritze (26G-Kanüle) gepresst. Durch eine erneute Zentrifugation mit 5000 rpm über 5 min bei 4°C wurde der Überstand als cytoplasmatische Extrakt aliquotiert und bei -70°C eingefroren, um ggf. für weitere RNA-Analysen genutzt zu werden. Das den nukleären Anteil enthaltende Pellet wurde mit eiskaltem Puffer C resuspendiert und durch Vortexen über 15 min bei 4°C und anschließendes erneutes Zentrifugieren (1300 rpm bei 4°C)

lösliche Proteine abgetrennt. Der Überstand mit den darin enthaltenen Kernextrakten und Protein wurde nun bei -70°C gelagert.

### 3.7.2 „Annealing“ von Oligonukleotiden

Die Protein-DNA-Bindungsstudien wurden mit doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Zur Renaturierung der Oligonukleotide wurden 10-20 µg komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide äquimolar in 50 µl TE / 0,1 M KCl gemischt und die Lösung nach kurzem Erhitzen für 5 min bei ca. 90°C über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

### 3.7.3 Labeling von Oligonukleotiden

Die radioaktive Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide erfolgte durch Kinasierung am 5`-Ende mittels T4-Polynukleotidkinase mit radioaktivem Phosphor (<sup>32</sup>P).

Dazu wurden 50 ng DNA, 2 µl 10x PNK-Puffer, 2 µl g<sup>32</sup>P-ATP (20 µCi) und eine Einheit T4-Polynukleotidkinase mit doppelt destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Reaktion erfolgte bei 37°C über 30 min Um die Reaktionsprodukte von nichtmarkierten Nukleotiden abzutrennen, wurde der Reaktionsansatz mit Gelladepuffer vermischt auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und bei einer Spannung von 230 V über 2,5 h aufgetrennt. Nach Lokalisation der radioaktiv markierten Oligonukleotide durch kurzes Auflegen eines Röntgenfilms erfolgte das Ausschneiden der radioaktiven Bande aus dem Gel. Die Elution erfolgte nach Zerstoßen des Gels in 0,1 M KCl in TE durch permanente Agitation bei 4°C für über 12 h. Anschließend wurde die spezifische Aktivität mit einem Szintillationszähler bestimmt.

### 3.7.4 Gelshift

Um eine *in vitro*-Bindung von Proteinen an DNA nachzuweisen, wurden nach Inkubation der Proteinextrakte mit radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotiden die entstandenen Protein-DNA-Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Aufgrund unterschiedlicher Größe und Ladung weisen DNA-Protein-Komplexe eine im Vergleich zur ungebundenen DNA eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ("Retardierung" oder "Shift") auf und wurden somit von den ungebundenen Oligonukleotiden abgetrennt. Um eine mögliche unspezifische Bindung von Proteinen an die markierte Probe zu verhindern, wurden synthetische Oligonukleotide (poly-dI/dC) in großem Überschuss im Verhältnis zur Probenmenge hinzugefügt. Der Nachweis einer spezifischen Bindung ließ sich durch Zugabe steigender Mengen nichtmarkierter Proben führen (5-100 ng).

Die Durchführung der Gelshift-Assays erfolgte nach folgendem Schema:

4 µl 3x Bindungspuffer, 500 ng poly-dI/dC (0,5 µl) und 5000 cpm (ca. 0,2 ng) markierte DNA wurden pro Ansatz zu einem "Mastermix" angesetzt. Dieser „Mastermix“ wurde nach Auffüllen mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl auf Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit dem jeweiligen Proteinextrakt (2 µg) gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Um spezifisch bindende Proteine nachweisen zu können, wurden 0,3 – 1 µg geeigneter Antikörper zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen Polyacrylamidgel (ca. 2,5 h, 230 V, Laufpuffer 0,5 x TBE, welches zuvor ca. 2 h vorgelaufen war) parallel zu einem Farbmarker, da die Ansätze ohne Farbmarker geladen wurden. Nach Trocknung des Gels auf einem Gelrockner erfolgte die Darstellung auf einem Röntgenfilm durch Exposition zwischen 24 und 48 (bis 50) Stunden.

### **3.8 Western blot**

Das denaturierende Polyacrylamidgel erlaubt die Auftrennung von Proteinen oder Polypeptiden entsprechend ihrem Molekulargewicht. Es besteht aus einem 5%igen Sammelgel und einem 6-15%igen Trenngel mit unterschiedlichen pH-Werten.

Die Gele wurden wie folgt hergestellt:

#### **Trenngel (10 ml):**

1,5 M Tris, pH 8,8 2,5 ml  
"Gel30" 2,0-5,0 ml  
10% SDS 0,1 ml  
ddH<sub>2</sub>O 5,3-2,3 ml  
10% APS 0,1 ml  
TEMED 8,0 µl

#### **Sammelgel (10 ml):**

1,0 M Tris, pH 6,8 1,25 ml  
"Gel30" 1,7 ml  
10% SDS 0,1 ml  
ddH<sub>2</sub>O 6,8 ml  
10% APS 0,1 ml  
TEMED 10,0 µl

#### **Gellauf:**

Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit 200-300 µl H<sub>2</sub>O überschichtet, um einen vollständigen geradlinigen Abschluss der Polymerisation zu erzielen. Nach der Polymerisation wurde es abgegossen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und vor der Polymerisation ein geeigneter Kamm in das Sammelgel eingesteckt. Die jeweiligen Proteinextrakte (1-20 µg) wurden mit DS-Gelladepuffer gemischt, 3 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte mit SDS-Laufpuffer bei etwa 10V/cm.

"Blotting" und Detektion der Proteine:

Um bestimmte Proteine nachzuweisen, wurde das Gel über Nacht in einer "Tank-Blotting-Apparatur" (Hofer) bei 250 mA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Danach wurde die Membran luftgetrocknet und eine Stunde mit 5 % fettarmem Milchpulver in TBS/0,05% Tween (TBS-T) geblockt.

Der erste Antikörper wurde in 5% Milch/TBS-T entsprechend verdünnt und ebenfalls eine Stunde inkubiert. Es folgten fünf Waschungen über fünf Minuten in TBS-T. Der zweite, an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Antikörper, wurde ebenfalls in 5% Milch/TBS-T verdünnt, 1 h bei RT inkubiert und die Membran abschließend fünfmal mit TBS-T gewaschen.

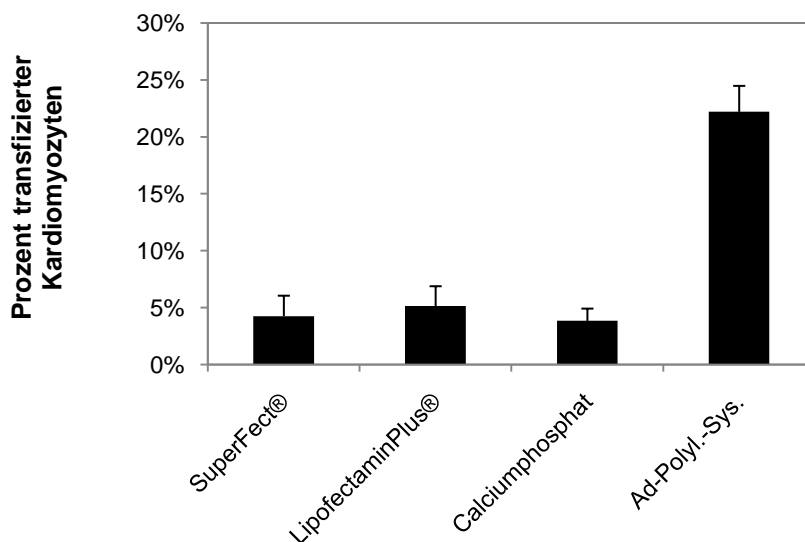
Die Detektion erfolgte nichtradioaktiv mit dem ECL-System (Amersham) nach Angaben des Herstellers.



## 4 Resultate

### 4.1 Vergleich von viralen mit nichtviralen Transfektionssystemen an neonatalen Herzmuskelzellen

Bei allen Transfektionsmethoden wurde zur Ermittlung der optimalen Bedingungen neben Dosis-Wirkungs-Versuchen für jeden Parameter in Anlehnung an die Angaben der Hersteller auch jeweils die Inkubationsdauer optimiert.



**Abb. 4.1-1:** Vergleich verschiedener Transfektionssysteme an neonatalen Kardiomyozyten

Nach jeweiliger Systemoptimierung nach Angaben der Hersteller erfolgte die vergleichende Untersuchung der Transfektionssysteme Superfect®, LipofectAMIN Plus™, Calciumphosphat mit dem Adenovirus-Poly-L-Lysin-System.

Neonatale Kardiomyozytenkulturen wurden am Tag 2 mit CMV-LacZ unter den optimierten Systembedingungen der jeweiligen Transfektionsmethode transfiziert. Die Auswertung erfolgte 24 Std. nach Transfektion mit Hilfe der Beta-Galaktosidasefärbung, wie unter Abschnitt 3.6.2 ausführlich beschrieben. Die Berechnung der Transfektionseffizienz ergab sich durch die Anzahl der  $\beta$ -gal-gefärbten Zellen dividiert durch die Gesamtzahl der Zellen.

n=4 für Superfect®, n=5 für LipofectAMIN Plus™, n=5 für Calciumphosphat, n=10 für das adenovirale Poly-L-Lysin-Komponentensystem.

Während die nichtviralen Transfektionsmethoden im Durchschnitt eine deutlich unter 10% liegende Transfektionseffizienz aufwiesen und dabei eine hohe Schwankungsbreite zeigten, stellte sich die adenoviral gestützte Transfektion mit einer geringen Streubreite als effizientes Verfahren mit einer durchschnittlichen Effizienz von 22% dar.

Daneben erfolgte eine Untersuchung der Auswirkung der Konfluenz sowie Alter der Zellen zum Transfektionszeitpunkt (Daten nicht gezeigt).

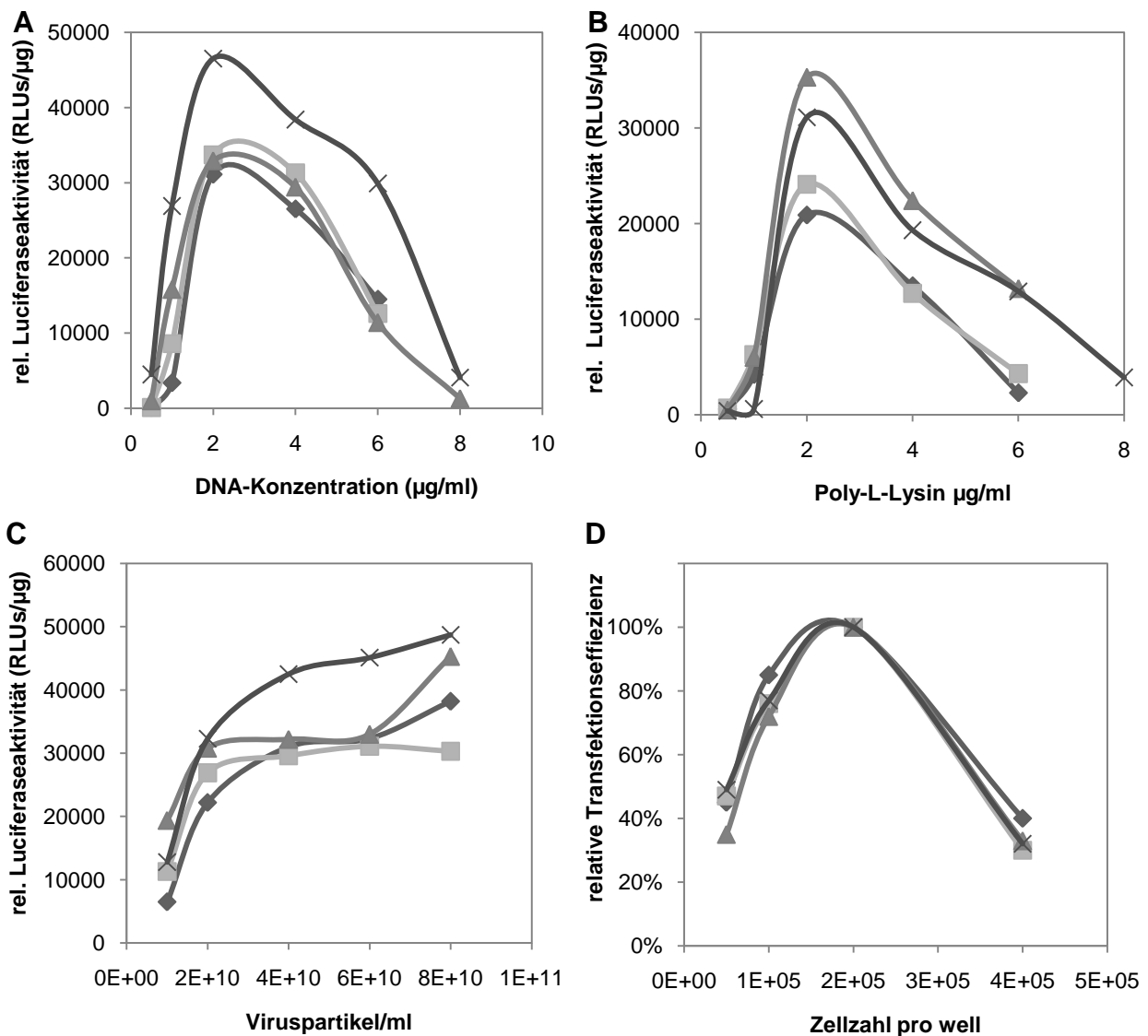
Sämtliche getesteten nichtviralen Transfektionsmethoden stellten sich aufgrund ihrer enormen Schwankungsbreite als unzuverlässig und in Bezug auf die Transfektionseffizienz bei durchschnittlicher Effizienz von 5% als durchwegs ungenügend heraus. Mit dem adenoviral unterstützten Poly-L-Lysin-Komponentensystem ließ sich eine replizierbare, konstante Transfektionseffizienz von über 20% erreichen. Die Abb. 4.1-1 zeigt den Vergleich der nichtviralen Systeme mit dem adenoviral unterstützten Komponentensystem.

#### **4.2 Systemoptimierung des Komponentensystems**

Da alle getesteten nichtviralen Transfektionssysteme für den Gentransfer in neonatale Kardiomyozyten durchwegs enttäuschende Ergebnisse lieferten und darüber hinaus eine hohen Schwankungsbreite aufwiesen, stellten sie sich damit als ungeeignet für eine Promotorstudie heraus. Da die Herstellung von adenoviralen Vektoren (Adenoviren mit fest integrierter Plasmid-DNA) bei einer Vielzahl von Plasmiden im Rahmen einer Promotorstudie extrem zeitaufwendig ist, wurde von einer adenoviralen Transfektionsmethode Abstand genommen und stattdessen das adenoviral gestützte Transfektionssystem (Poly-L-Lysin-Komponentensystem) etabliert (Kohout et al. 1996).

Die Optimierung des Komponentensystems umfasste folgende Parameter: optimale Mischungsverhältnisse aller Komponenten (Viruskonzentration, DNA-Menge, Poly-L-Lysin), optimale Dichte der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion, Inkubationsdauer zum Erreichen einer maximalen Zielgenexpression, optimales Medium mit dem Ziel der Serumfreiheit zur Durchführung weiterer Studien, insbesondere der anschließenden Promotorstudie.

Als primär untersuchte Variable wurde die DNA-Konzentration des Transfektionsmediums bei konstanter Adenovirusmenge und gleichbleibenden Poly-L-Lysin-Verhältnis gewählt. Hier zeigte sich ein klares Maximum bei einer DNA-Konzentration von 2-3 µg/ml Transfektionslösung, so dass diese Konzentration bei allen weiteren Parameterveränderungen beibehalten wurde.



**Abb. 4.2-1:** Optimierung des Adenovirus-Polylysins-Systems zur Transfektion neonataler Kardiomyozyten

Neonatale Kardiomyozytenkulturen wurden am Tag 2 mit CMV-luc mit dem Adenovirus-Poly-L-Lysin-System transfiziert. Die Auswertung erfolgte 24 Std. nach Transfektion durch Messung der Luciferaseaktivität, wie unter Abschnitt 3.6.2 ausführlich beschrieben.

(A) Vergleich verschiedener DNA-Konzentrationen bei konstanter Virus- und Poly-L-Lysin-Menge (Polylysins konstant 2  $\mu$ g/ml, Adenovirus 4 x 10<sup>10</sup> Partikel/ml Transfektionslösung, n=4).

(B) Vergleich unterschiedlicher Poly-L-Lysin-Konzentrationen bei konstanter Virus- und DNA-Menge (Adenovirus 4 x 10<sup>10</sup> Partikel/ml, konstante DNA-Konzentration von 2  $\mu$ g/ml Transfektionslösung, n=4).

(C) Vergleich steigender Adenovirus-Konzentrationen bei konstanter DNA-Menge und Poly-L-Lysin-Konzentration (konstante DNA-Konzentration von 2  $\mu$ g/ml, Poly-L-Lysin 2  $\mu$ g/ml Transfektionslösung, n=4).

(D) Vergleich verschiedener Zelldichten bei optimaler Transfektionslösung (DNA-Konzentration von 2  $\mu$ g/ml, Poly-L-Lysin 2  $\mu$ g/ml, Adenovirus 4 x 10<sup>10</sup> Partikel/ml Transfektionslösung, n=4). Bis auf die Adenoviruskonzentration wiesen alle Parameter eine Normalverteilung mit eindeutigem Maximum auf. Bei steigenden Adenoviruskonzentrationen ließ sich innerhalb der getesteten Konzentrationen keine Sättigung feststellen.

Als zweite Variable wurde das Verhältnis Polylysin-/DNA-Verhältnis untersucht. Hierzu erfolgte die Titration von Poly-L-Lysin von 0,5 µg/ml bis 8 µg/ml Transfektionslösung bei gleichbleibender DNA-Konzentration von 2 µg und einer Adenovirusmenge von  $4 \times 10^{10}$  Partikeln/ml. Hier fiel eine scharfe Maximumbildung im Bereich 2-3 µg Poly-L-Lysin pro ml Transfektionsmedium auf. Ein Abweichen von der Idealkonzentration bewirkte eine deutliche Abschwächung der Transfektionseffizienz.

Die Adenoviruskonzentration wurde als dritter Parameter evaluiert, wobei sämtliche zuvor ermittelten Idealkonzentrationen von Poly-L-Lysin (2 µg/ml) und DNA-Konzentration (2 µg/ml) beibehalten wurden. Interessanterweise ließ sich bei den untersuchten Virusmengen keine Sättigung feststellen, auch bei deutlich erhöhter Virusmenge über  $2 \times 10^{11}$  Partikel pro ml Transfektionslösung setzte sich der Trend einer steigenden Transfektionseffizienz fort (Daten nicht gezeigt).

Entgegen der Beschreibung von Kohout konnte keine Schädigung der Herzmuskelzellen durch die höhere Virusbelastung auch bei über der als toxisch angesehenen Konzentrationsgrenze von  $5 \times 10^4$  Partikeln pro Zelle festgestellt werden. Qualitativ unterschiedliche Viruspräparationen resultierten in einer ausgeprägten Differenz der Transfektionseffizienz, unabhängig von der Infektiosität, die in der Anzahl der plaque forming units (PFU) gemessen werden konnte.

Als weitere Variablen des Adenovirus-Komponentensystems wurden optimaler Transfektionszeitpunkt, optimale serumfreie Mediumzusammensetzung und Zelldichte bei konstant gehaltenem optimierten Transfektionsgemisch untersucht. Die optimale Zelldichte lag bei Herzmuskelzellen bei ca. 80% Konfluenz nach einer Aussaat von 200.000 Zellen/Well eines 24er Wells.

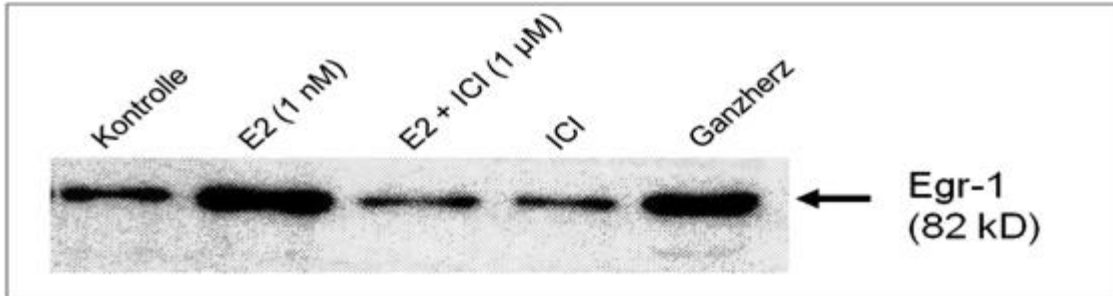
Als günstigster Zeitpunkt der Transfektion stellte sich der 3.-4. Tag nach Präparation heraus.

### 4.3 Untersuchung der östrogenvermittelten Geninduktion anhand des Egr-1-Promotors

#### 4.3.1 Die Egr-1-Expression in Kardiomyozyten ist ein direkter Effekt von Östrogen

Isolierte neonatale Kardiomyozyten wurden für 90 min mit 10 nM Östrogen inkubiert und die Proteinspiegel von Egr-1 auf Western blot-Ebene untersucht. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen fand sich ein deutlich höherer Proteinlevel von Egr-1 bei mit Östrogen inkubierten Zellen. Unter gleichzeitiger Gabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 wurde dieser Effekt aufgehoben. Im Vergleich zu Proteinextrakten aus ganzen Herzen neonataler Ratten zeigte sich ein ebenfalls hoher Proteinlevel, vergleichbar den mit Östrogen behandelten neonatalen Kardiomyozyten.

Das frühe Wachstumsgen Egr-1 ist also im Herzen nachweisbar und lässt sich ebenfalls in der Zellkultur durch Inkubation mit Östrogen induzieren.



**Abb. 4.3-1: Östrogen bewirkt die Expression des Early growth response gene 1 (Egr-1)**

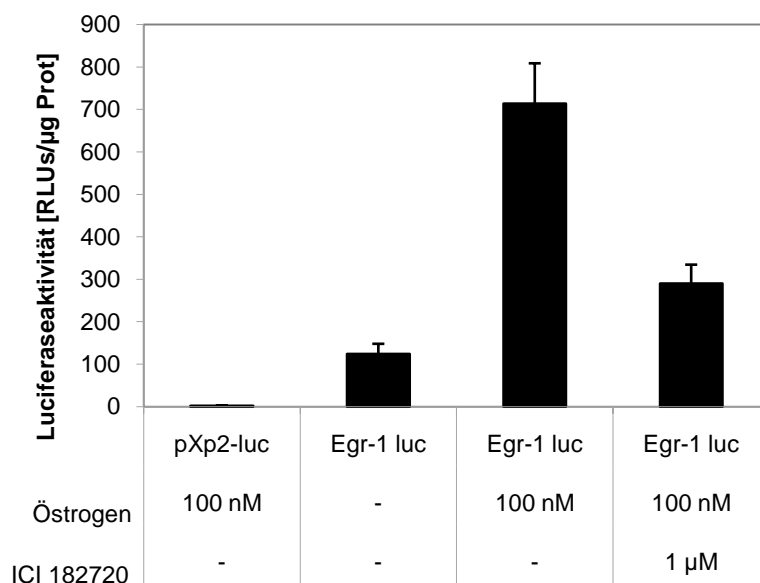
Gesamtproteinextrakte aus isolierten neonatalen Herzmuskelzellen unter Behandlung mit 10 nM 17 $\beta$ -Östradiol für 90 min wurden für die Herstellung der Western blots verwendet. Unter Östrogenbehandlung stieg die Egr-1-Proteinexpression stark an, dieser Effekt ist östrogenspezifisch, da er durch die zusätzliche Behandlung mit dem Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 (1  $\mu$ M) aufgehoben wird. In der letzte Lane (rechts) erfolgte der Nachweis von Egr-1 im Herz neonataler Ratten.

Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 voneinander unabhängig durchgeführten Western blots.

#### 4.3.2 Der Egr-1-Promotor wird durch Östrogen 6-fach induziert

Um die Induzierbarkeit des Egr-1-Gens durch Östrogen, die sich auf Western blot-Ebene bereits darstellen ließ, auch quantitativ beurteilen zu können, sollte die Expression des Promotors mit Hilfe eines Reportergens untersucht werden. Hierzu wurde der in einen pXP-2-Luciferase-Basisvektor einklonierte komplette murine Egr-1-Promotor („Egr-1-luc“) mit Hilfe des viral unterstützten Poly-L-Lysin-Komponentensystems transient in isolierte primäre neonatale Kardiomyozyten transfiziert.

Unter 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol konnte 24 Stunden nach Transfektion eine deutliche 5,7-fache Aktivitätssteigerung von Egr-1-luc im Vergleich zur Luciferaseaktivität ohne Östradiol festgestellt werden. Der Induktionseffekt von Östrogen ließ sich bei gleichzeitiger Inkubation von Östrogen und dem Östrogenrezeptorantagonist ICI 182780 wieder auf 41% zurückführen (vgl. Abb. 4.3-2). Ebenso hob das Antiöstrogen Tamoxifen den induktiven Östradiol-Effekt weitgehend wieder auf.



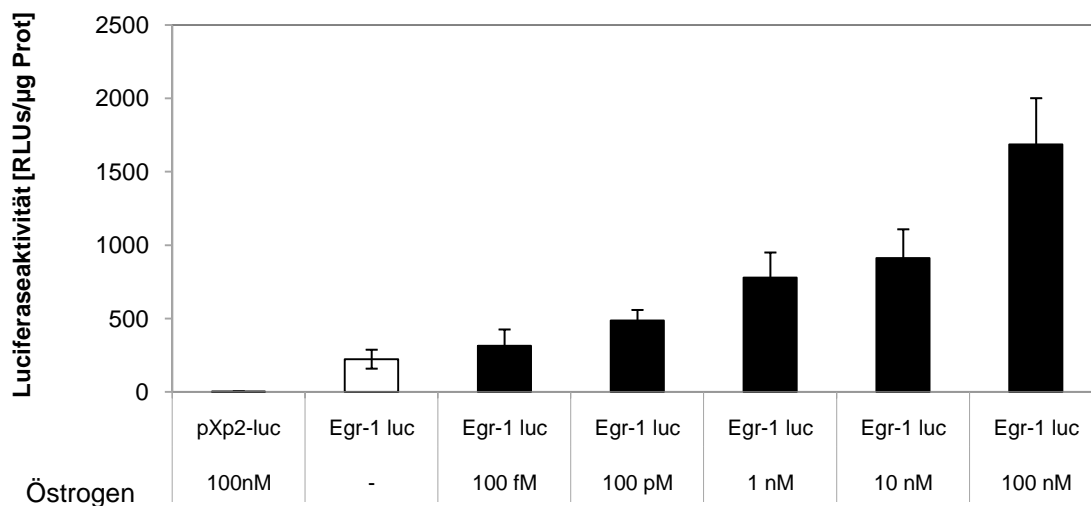
**Abb. 4.3-2: Induktion des Egr-1-Promotors durch 17 $\beta$ -Östradiol**

Egr-1-luc wurde transient in primäre neonatale Kardiomyozyten transfiziert. 3 h nach Transfektion wurde das östrogenfreie Medium durch Medium ohne Zusatz oder mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol mit oder ohne ICI 182720 (1  $\mu$ M) für 18 h ersetzt. Unter Östrogen stieg die Aktivität von Egr-1-luc um über 500%, der Effekt war reversibel durch Zugabe von ICI (1  $\mu$ M). Als Kontrolle fungierte pXP2-luc.

Die dargestellten Resultate sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 8 unabhängigen Experimenten,  $p \leq 0,005$ .

Der komplette Egr-1-Promotor zeigte auch ohne Östradiolzusatz im Medium eine deutliche Grundaktivität verglichen mit dem Leervektor pXP2-luc.

Die Fragestellung, ob der Egr-1-Promotor auch durch physiologische Konzentrationen von Östrogen induziert werden kann, wurde mittels Dosis-Wirkungs-Experimenten untersucht. Neonatale Kardiomyozyten wurden wie oben beschrieben mit Egr-1-luc transfiziert und für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen 17 $\beta$ -Östradiol (0 – 100 nM) inkubiert. Bereits bei einer Konzentration von 100 pM zeigte sich eine signifikante Steigerung der Luciferase-Aktivität des Promotors um den Faktor 2,2 bezogen auf die Promotoraktivität ohne Östrogen (vgl. Abb. 4.4-3). Während die Inkubation mit 100 fM Östrogen keine signifikante Änderung der Expression erkennen ließ, ergab die bei Frauen physiologische Östrogenkonzentration von 10 nM einen deutlichen 4-fachen Anstieg. Da mit einer Konzentration von 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol eine Steigerung um den Faktor 7,5 zu erreichen war, wurde diese Konzentration für die weitere Promotorstudie beibehalten, um mögliche schwache Östrogeneffekte nicht zu übersehen.



**Abb. 4.3-3: Induktion des Egr-1-Promotors durch unterschiedliche Konzentrationen von 17 $\beta$ -Östradiol**

Transient mit Egr-1-luc transfizierte neonatale Kardiomyozyten wurden für 18 h mit 17 $\beta$ -Östradiol in Konzentrationen von 100 fM bis 100 nM inkubiert.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Aktivitätssteigerung des Egr-1-Promotors, die auch in subphysiologischen Konzentrationen (100 Picomolar Östrogen) eine signifikante Geninduktion aufwies.

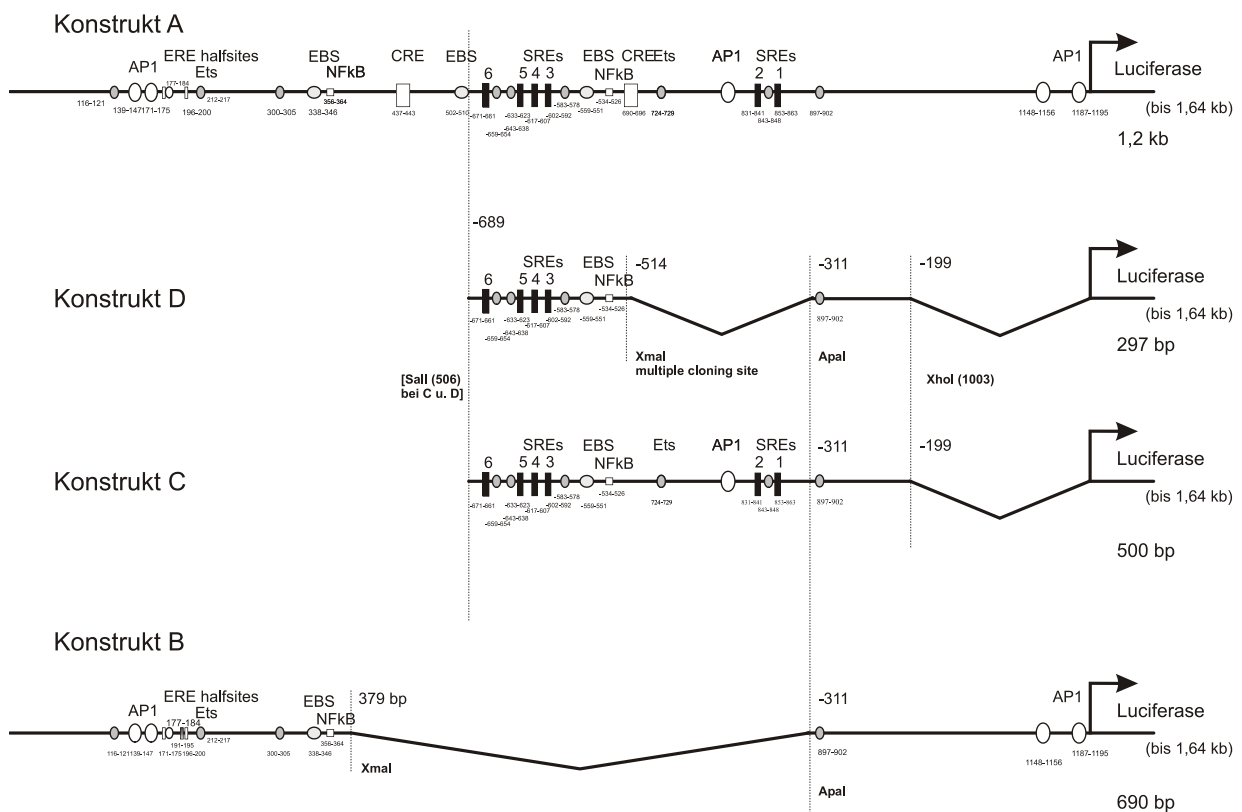
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von > 7 unabhängigen Experimenten,  $p \leq 0,009$  (außer E2 100 fM). pXp2-luc diente als Negativkontrolle.

### 4.3.3 Die östrogenabhängige Induktion des Egr-1-Promotors erfolgt nicht über die ERE-, sondern über SRE-Bindungsstellen

Von diesen Befunden ausgehend stellte sich nun die Frage nach den DNA-Abschnitten, die im Einzelnen für die Induktion des Egr-1-Promotors durch Östrogen verantwortlich zu machen sind. Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten des Egr-1-Promotors verwendet.

Der murine Egr-1-Promotor weist eine Länge von 1,2 kb auf und besitzt verschiedene DNA-Bindungsstellen.

Zunächst sollten die klassischen Bindungsstellen für Östrogen, die Östrogen responsive Elemente (ERE), auf ihre transkriptionelle Aktivität hin untersucht werden. Der Aufbau der ERE ist klassischerweise palindromisch: 5' GGTCANNN TGACC 3'. Dabei stellen die vorderen vier bzw. hinteren vier Basenpaare sogenannte ERE-halbsites dar, die durch drei beliebige Basenpaare voneinander getrennt sind. Im Egr-1-Promotor finden sich zwei entgegengesetzt gerichtete ERE-halbsites an den Positionen nt -1029 und nt -1004. In unmittelbarer Nähe dazu liegen zwei AP-1 sites (nt -1084 und nt -1061).





**Abb. 4.3-4: Darstellung des kompletten Egr-1-Promotors und seiner Deletionsmutanten**

Die Analyse der Egr-1-Promotorsequenz im Hinblick auf Bindungsstellen für transkriptionsregulierende Faktoren ergab folgende Komponenten:

Der komplette Egr-1-Promotor enthält bei einer Gesamtlänge von 1,2 kb im am weitesten downstream gelegenen Anteil (5'-Ende) zwei ERE-halbsites mit flankierenden AP-1-sites (nt -1061 bis -1000), eine Egr-1-binding site (EBS) bei nt -862 bis -854 sowie bei nt -698 bis -690. Von den insgesamt sechs SRE stehen die ersten vier (Nr. 6-3, vgl. Abb.) in unmittelbarer Nachbarschaft und in der Nähe von Ets-sites, die beiden letzten SRE befinden sich in Bereich von nt -369 bis -337.

Desweiteren fanden sich zwei CRE (cAMP responsive elements) sowie eine NF $\kappa$ B-site bei nt -534; am Anfang des Promotors finden sich zwei weitere AP-1-binding sites.

Konstrukt C (500 bp) beginnt bei nt -689 des Egr-1-Promotors und weist zusätzlich eine Deletion im Bereich nt -199 bis nt 0 auf. Daraus entfallen die ERE-binding sites im 5'-Bereich, so dass im Wesentlichen die 6 SRE mit benachbarten Ets-sites als Bindungsstellen für transkriptionelle Regulationsfaktoren zur Verfügung stehen.

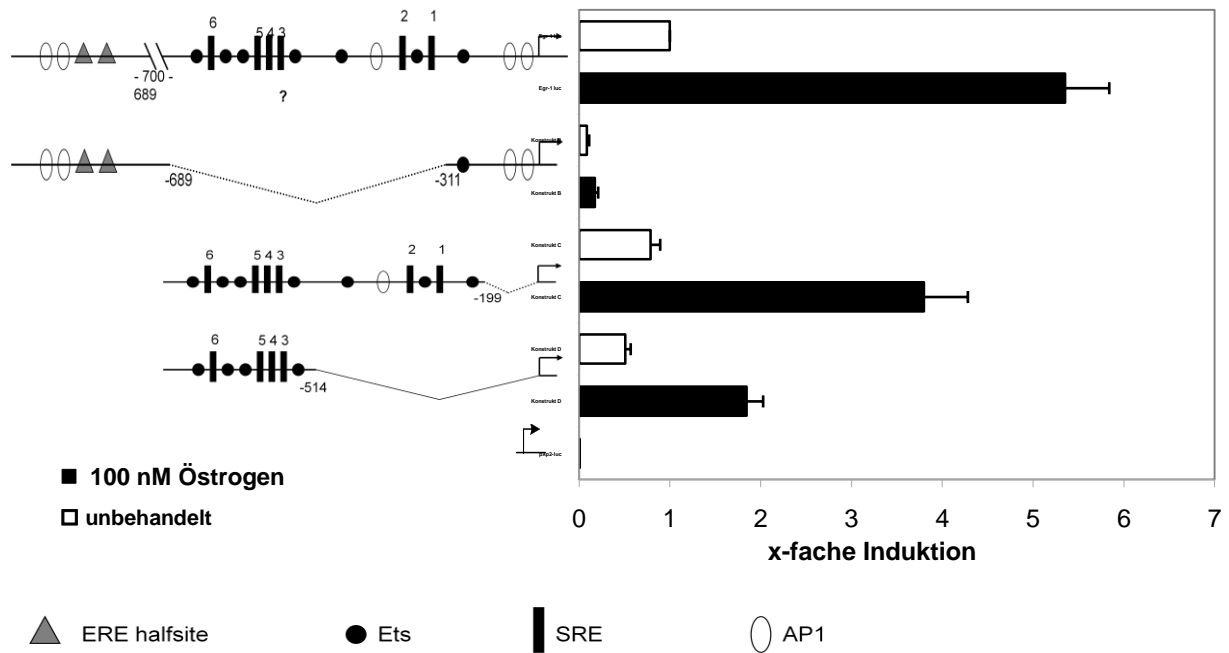
Konstrukt D mit 287 bp unterscheidet sich von Konstrukt C lediglich durch eine weitere Deletion von nt -514 bis -311, so dass die proximalen zwei SRE entfallen.

Konstrukt B (690 bp) ist von nt -821 bis -311 deletiert, woraus ein distaler Bereich mit ERE-halbsites und flankierenden AP-1 sites sowie ein proximaler Bereich mit zwei AP-1 sites resultieren.

Die Bedeutung der ERE für die Induzierbarkeit des Egr-1-Promotors wurde anhand des Konstrukts B (2 ERE-halbsites mit flankierenden AP-1-sites) untersucht.

Nach transienter Transfektion wurde jeweils die Luciferaseaktivität unter 18-stündiger Stimulation mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol bzw. ohne mit der Aktivität des kompletten Promotors verglichen (vgl. Abb.4.3-5). Unstimuliert erreichte Konstrukt B nur etwa 10 % der Promotoraktivität ohne Östrogen. Unter 100 nM Östrogen (18 h) wurde Konstrukt B um den Faktor 2 induziert, erreichte also auch unter hoher Östrogenstimulation nur 20% der Aktivität des unstimulierten vollständigen Promotors. Die Geninduktion des Egr-1-Promotors durch Östrogen ließ sich also nicht über den klassischen Induktionsweg unter Bindung der Östrogenrezeptoren an die östrogenresponsiven Elemente (ERE) des Promotors nachweisen.

Da die beim vollständigen Egr-1-Promotor mit Östrogen erzielte Aktivität um ein Vielfaches höher waren, als dies mit Konstrukt B möglich war, stellte sich die Frage nach der Bedeutung der SRE für die Induktionswirkung des Östrogens.



**Abb. 4.3-5: Induktion von Egr-1-luc und seinen Deletionsmutanten**

In neonatale Kardiomyozyten wurde transient Egr-1-luc bzw. die Deletionsmutanten Konstrukt B-D transfiziert und 18 h unbehandelt (□) bzw. mit 100 nM 17β-Östradiol (■) inkubiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Bezogen auf Egr-1-luc erreichte Konstrukt B (zwei ERE-halfsites in Verbindung mit 2-3 AP1-Bindungsstellen, keine SRE) nur ca. 1/10 der vollen Promotoraktivität und ließ sich auch mit Östradiol nur um den Faktor 2 induzieren. Im Gegensatz dazu weisen Konstrukt C und D unstimuliert eine hohe Aktivität auf (80 bzw. 50%) auf, die sich durch Östrogengabe um den Faktor 4 stimulieren lässt. Sowohl stimuliert als auch unstimuliert besteht zwischen Konstrukt C und D keine Signifikanz, während zu Egr-1-luc eine signifikante Aktivitätsdifferenz besteht.

Ergebnisse aus n > 6 unabhängigen Experimenten, die Aktivität der Konstrukte als Mittelwerte ± Standardfehler unterschieden sich mit p ≤ 0,0006 hochsignifikant von Egr-1-luc (Konstrukt C ohne E2 und Konstrukt D mit E2 signifikant mit p ≤ 0,03). Der Leervektor pXp2-luc diente als Kontrolle.

Konstrukt C besitzt die Promotorsequenz von nt -689 bis -199, womit alle sechs SRE des Egr-1-Promotors enthalten sind. Hier zeigte sich nahezu die Aktivität des vollständigen Promotors mit 80%, die sich unter 100 nM 17β-Östradiol um den Faktor 5 steigern ließ, so dass Konstrukt C auch unter Östrogenstimulation 70% der Aktivität des stimulierten kompletten Promotors beibehält. Daraus ergibt sich die Folgerung, dass die vor nt -689 liegenden ERE-halfsites samt AP-1-sites auch in Herzmuskelzellen kaum funktionelle Bedeutung besitzen, wie dies McMahon schon für B-Lymphozyten 1995 zeigen konnte (McMahon, Monroe 1995).

Mit Konstrukt D, das nur die ersten vier SRE aufweist (Aufbau wie Konstrukt C, aber zusätzliche Deletion von nt -514 bis -311), konnte im Vergleich zum Originalpromotor

noch eine 50%ige Induktion erreicht werden. Auch Konstrukt D ließ sich durch 100 nM Östradiol um den Faktor 4 induzieren, was im Vergleich zum stimulierten Egr-1-luc mit einer 40%igen Aktivität gleichzusetzen war.

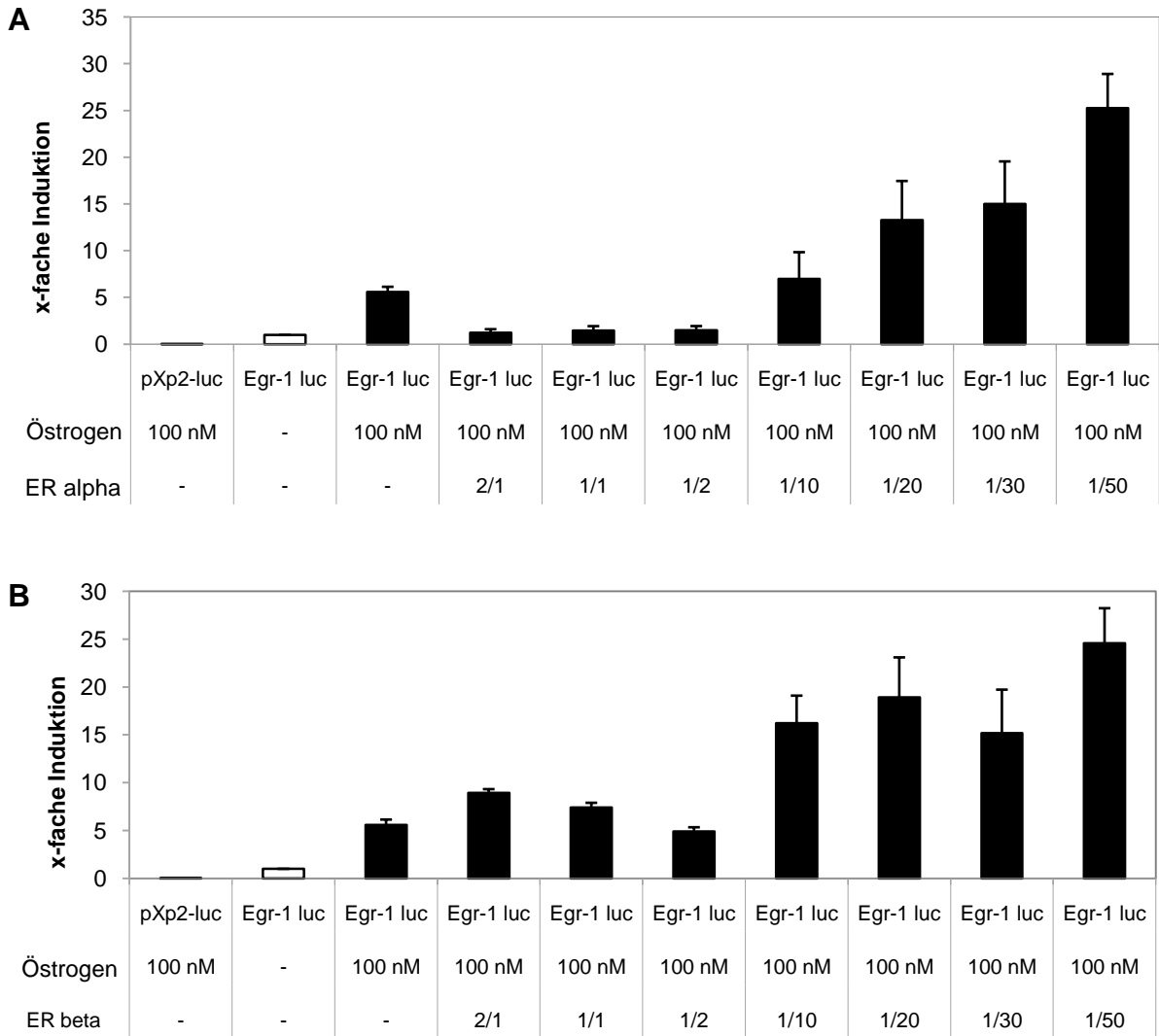
Während sich Konstrukt C und D sowohl stimuliert als auch unstimuliert signifikant von den Werten des vollständigen Promotors unterschieden, ließ sich zwischen den beiden Konstrukten C und D selbst keine signifikanten Unterschiede feststellen, wenn sich auch Konstrukt D tendenziell schwächer darstellte als Konstrukt C (vgl. Abb. 4.3-5 **B** u. **C**).

Die Hauptinduktion des Egr-1-Promotors erfolgte also durch die SRE ab nt -689, wobei die ersten vier SRE zwischen nt -689 bis -514 die entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

#### 4.3.4 Bedeutung der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$ und ER $\beta$ für die Regulation von Egr-1-luc durch Östrogen

Da 17 $\beta$ -Östradiol zur Steroidhormonfamilie gehört, die ihre transkriptionell aktivierende Wirkung zum größten Teil rezeptorvermittelt entfaltet, lag es nahe, die Funktion der beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  in diesem Prozess zu untersuchen. Um unterscheiden zu können, ob die östrogeninduzierte Aktivitätssteigerung des Egr-1-Promotors durch den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  oder ER $\beta$  vermittelt wird, musste der jeweilige Östrogenrezeptor in die Herzmuskelzelle zusammen mit dem Reporter gen kotransfiziert werden. Auf diese Weise kann man bona fide aufgrund des Überschusses eines Rezeptors eine Induktionsverstärkung auf diesen zurückführen, wobei hier die mögliche endogene Rezeptorexpression und Funktionalität desselben vernachlässigt werden kann. Zunächst musste die optimale DNA-Menge des Rezeptors im Verhältnis zu Egr-1-luc ermittelt werden.

Die Transfektion der isolierten neonatalen Kardiomyozyten erfolgte stets unter Beibehaltung der Gesamt-DNA-Menge, variiert wurde lediglich das Verhältnis der DNA-Menge von kotransfiziertem Östrogenrezeptor zu Reporter gen. Dazu wurden jeweils der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  und ER $\beta$  in einer Menge von 1/50 von Egr-1-luc bis zu einem Verhältnis von 2:1 (ER zu Egr-1-luc) kotransfiziert. Nach einer Inkubation von 18 h mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität.



**Abb. 4.3-6: Östrogenrezeptor-Dosisfindung bei Kotransfektion von Egr-1-luc und der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$**

Mit einer DNA-Gesamtmenge von 3  $\mu$ g wurden neonatale Kardiomyozyten mit Egr-1-luc und unterschiedlichen Konzentrationen des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  (Abb. A und B) kotransfiziert. Ausgehend von einem Verhältnis ER zu Egr-1-luc von 2/1 1/50 wurde bis zu einem Verhältnis von 2/1 titriert. Nach einer 18-stündigen Inkubation mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol wurde die Luciferaseaktivität im Vergleich zu Egr-1-luc ohne Östrogen bestimmt. Bei im Verhältnis zu Egr-1-luc abnehmender DNA-Menge des Östrogenrezeptors stieg die Induktionsverstärkung ab einem Verhältnis von 1/10 der Östrogenrezeptor-DNA zu Egr-1-luc signifikant an.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten, bezogen auf Egr-1-luc ohne Östrogen. Die Luciferaseaktivität unter Kotransfektion des Östrogenrezeptors war ab einer niedrigeren Konzentration als 1/10 von Egr-1-luc im Vergleich zum unstimulierten Egr-1-luc signifikant höher ( $p \leq 0,01$ ).

Es ließ sich trotz erheblicher Abweichungen zwischen den verschiedenen Experimenten eine eindeutige Tendenz erkennen (vgl. Abb. 5.5-4): je geringer die DNA-Menge des kotransfizierten Östrogenrezeptors bei konstanter DNA-Menge von Egr-1-luc dosiert wurde, um so deutlicher wurde die Induktionsverstärkung durch den jeweiligen Östrogenrezeptor. Die höchste Induktionsverstärkung durch Kotransfektion der Östrogenrezeptoren zeigte sich bei einer Menge von 1/50 von Egr-1-luc.

Dies lässt sich durch die sehr starke Promotoraktivität der beiden Östrogenrezeptorplasmide erklären, die beide virale Promotoren besitzen (RSV-ER $\alpha$  und CMV-ER $\beta$ ), so dass bei einer Kotransfektion mit gleichen Mengen von Östrogenrezeptor-DNA und Egr-1-luc in den Herzmuskelzellen wesentlich mehr Östrogenrezeptor exprimiert wird als Egr-1-luc.

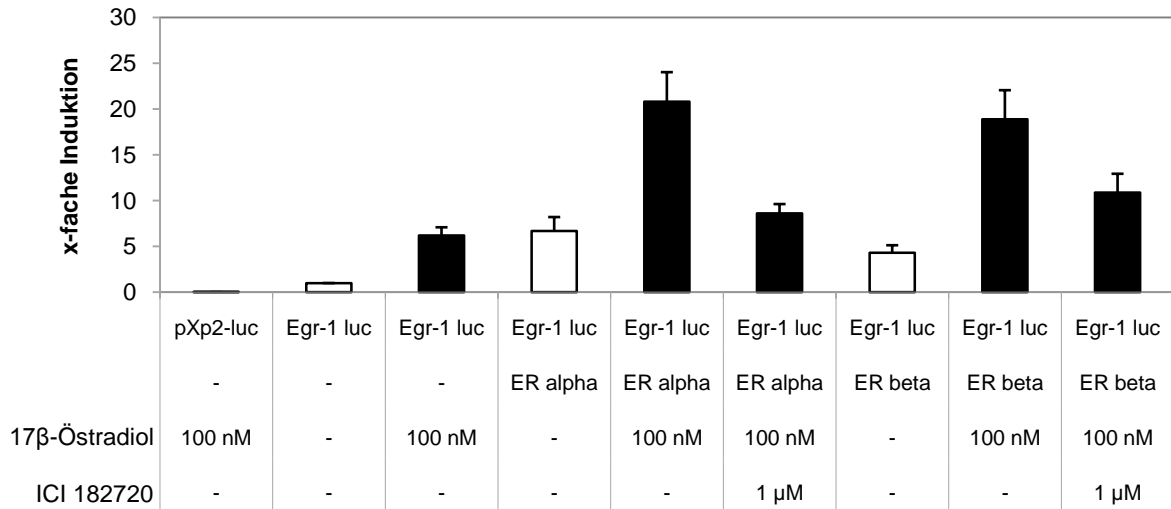
Bei der Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  bei einem Verhältnis zu Egr-1-luc im Bereich zwischen 2/1 bis 1/2 ließ sich sogar eine Abschwächung der östrogeninduzierten Luciferaseaktivität von Egr-1-luc beobachten, so dass kein signifikanter Unterschied zum unstimulierten Promotor mehr vorhanden war. Ab einem Verhältnis von 1/10 (Östrogenrezeptor-DNA zu Egr-1-luc) zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Verhältnis Östrogenrezeptor zu Egr-1-luc mit 1/50 für alle weiteren Versuche mit Kotransfektion eines Östrogenrezeptors beibehalten.

Zunächst wurde die Wirkung der beiden Östrogenrezeptoren auf den vollständigen Egr-1-Promotor untersucht. Hierzu wurde zu Egr-1-luc jeweils der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  oder ER $\beta$  in einem Verhältnis von 1/50 (von Egr-1-luc) kotransfiziert und nach einer Inkubation von 18 h mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol  $\pm$  ICI 182780 (1  $\mu$ M) die Luciferaseaktivität gemessen. Hierbei ließ sich die durch den Östrogenrezeptor und 100 nM Östrogen vermittelte Steigerung der Promotoraktivität um den Faktor 19 bzw. 18 (ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$ ) im Vergleich zum unstimulierten Egr-1-luc ohne Kotransfektion durch Zugabe von ICI 182780 wieder zurückführen (8,6fache bzw. 10,9fache Induktion), wie aus Abb. 4.3-7 ersichtlich.

Dies zeigte zum einen, dass durch Kotransfektion eines der beiden Östrogenrezeptoren die Östrogeninduktion von Egr-1-luc noch einmal verdreifacht werden kann (Anstieg von 6facher auf 18fache Induktion), zum anderen, dass dieser

rezeptorvermittelte Effekt durch einen Östrogenrezeptorantagonisten weitgehend wieder aufgehoben werden kann.



**Abb. 4.3-7:** Induktion von Egr-1-luc durch Östrogen in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren

Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 3 μg Egr-1-luc transient transfiziert, bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ERα bzw. ERβ betrug die DNA-Menge 1/50 von Egr-1-luc. Die Zellen wurden entweder unstimuliert unter 5% CPSR-1 für 18 h inkubiert oder mit 100 nM 17β-Östradiol ± 1 μM ICI versehen. Die Stimulation des Egr-1-Promotors durch 100 nM Östrogen um den Faktor 6 konnte durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ERα auf eine 19-fache, durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ERβ auf eine 18-fache Induktion erhöht werden. Diese Effekte ließen sich durch Zugabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 (1 μM) wieder verringern. Die Kotransfektion eines der beiden Östrogenrezeptoren ergab auch beim unstimulierten Promotor eine signifikante Aktivitätserhöhung um den Faktor 6 bzw. 4 (ERα bzw. ERβ) bezogen auf Egr-1-luc ohne Östrogen und ohne Kotransfektion. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 14 unabhängigen Experimenten (n = 6 bei allen ICI-Werten), bezogen auf unstimuliertes Egr-1-luc mit p ≤ 0,0016. Der Leervektor pXp2-luc diente als Kontrolle.

Angesichts dieser signifikanten Induktionsverstärkung durch beide Östrogenrezeptoren am vollständigen Egr-1-Promotor unter 100 nM Östrogen ergab sich die Überlegung, dass der gleiche Effekt auch bei den Konstrukten C und D, die ebenfalls eine starke Östrogeninduktion aufwiesen (vgl. Abb. 4.3-5), zu finden sein müsste. Dazu wurden zu den beiden Konstrukten C und D jeweils der Östrogenrezeptor (1/50 der Gesamt-DNA-Menge) kotransfiziert und nach 18 h mit 100 nM 17β-Östradiol ± ICI 182780 die Luciferaseaktivität gemessen.

Bezogen auf die jeweilige Kontrolle, nämlich Konstrukt C bzw. D ohne Östrogenbehandlung, ließ sich die bei beiden Konstrukten bereits festgestellte gleichartige Induktionswirkung durch 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol (Faktor 5-6) durch die Kotransfektion eines der beiden Östrogenrezeptoren jeweils verdoppeln (vgl. Abb. 4.3-8 **A** und **B**). Unter gleichzeitiger Zugabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 (1  $\mu$ M) ließ sich die Induktion wieder auf ein 4-6faches Niveau zurückführen.

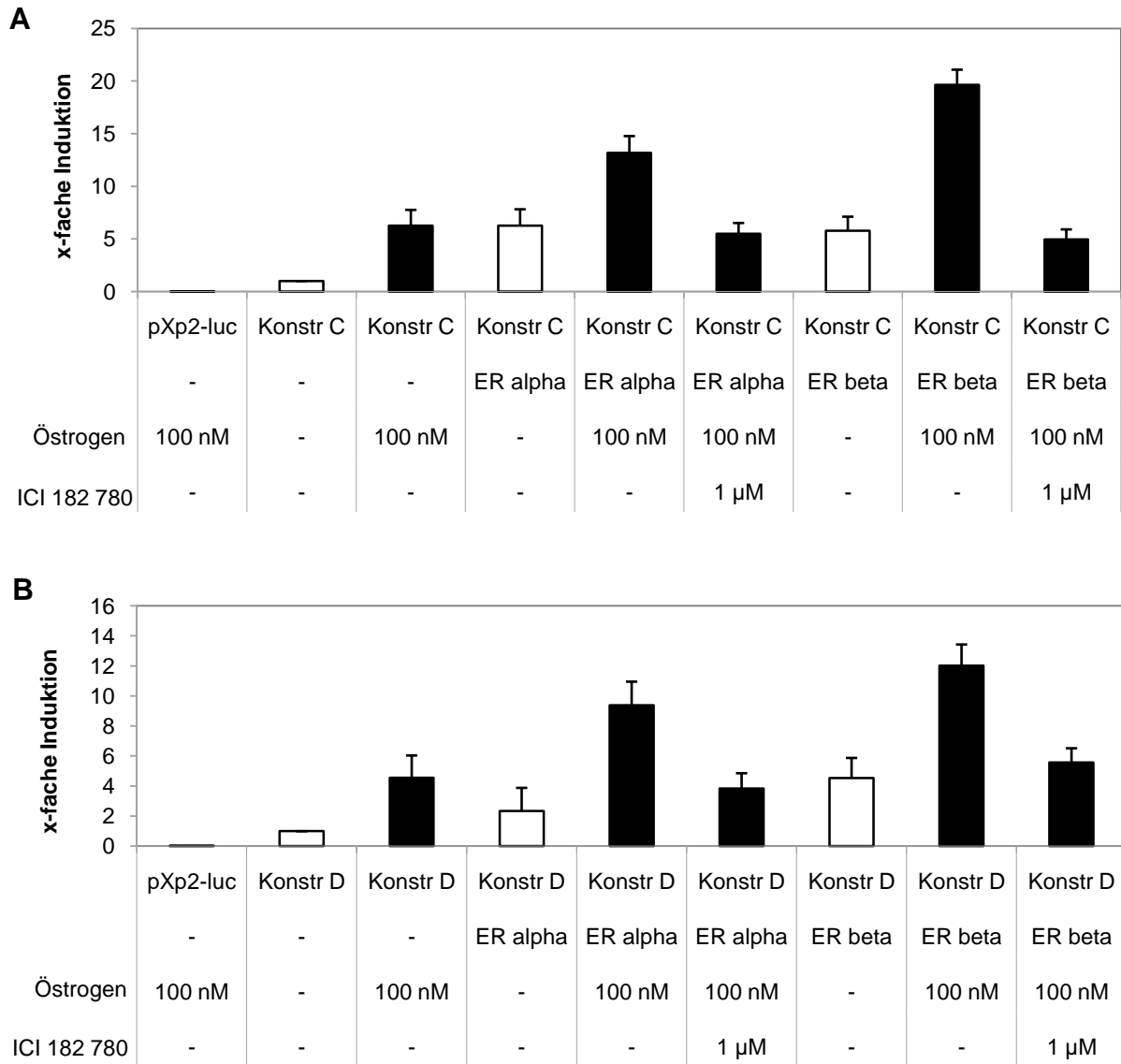
Ein signifikanter Unterschied zwischen der Luciferaseaktivität bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  und der Aktivität bei ER $\beta$ -Kotransfektion konnte nicht erfasst werden.

Außerdem zeigte sich bei unstimulierten Kardiomyozyten eine Steigerung der Luciferaseaktivität durch die Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  bei Konstrukt C um den Faktor 6, in gleicher Weise war dies bei ER $\beta$ -Kotransfektion der Fall.

In etwas abgeschwächter Form, aber ebenso signifikant ließen sich diese Effekte auch bei Konstrukt D feststellen: bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  stieg die Luciferaseaktivität um den Faktor 2,5 (gerade nicht signifikant) bezogen auf den unstimulierten Promotor ohne Kotransfektion, bei ER $\beta$  um den Faktor 4,5 (signifikant).

Sowohl Konstrukt C mit allen SRE als auch Konstrukt D mit den vorderen 4 SRE zeigte ein dem vollständigen Egr-1-Promotor fast identisches Induktionsverhalten unter 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol wie auch bei Kotransfektion der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$ .

## Resultate



### **Abb. 4.3-8: Vergleich der relativen Induktion von Konstrukt C und D**

Nach transienter Transfektion mit Konstrukt C (Abb. A) bzw. D (Abb. B), jeweils mit und ohne Kotransfektion eines der beiden Östrogenrezeptoren im Verhältnis 1/50 zum jeweiligen Konstrukt, wurde für 18 h mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol  $\pm$  ICI 182780 (1  $\mu$ M) inkubiert und die Luciferaseaktivität gemessen.

Sowohl Konstrukt C (alle SRE) als auch Konstrukt D (SRE 6-3) zeigte ein fast gleichartiges Induktionsverhalten wie Egr-1-luc, also eine Aktivitätssteigerung des unstimulierten Promotors um den Faktor 5, die sich durch Kotransfektion eines Östrogenrezeptors noch einmal verdoppeln ließ. Die östrogeninduzierte Steigerung der Luciferaseaktivität war bei beiden Konstrukten unter gleichzeitiger Inkubation mit 1  $\mu$ M ICI 182780 reversibel. Beide Östrogenrezeptoren zeigten bei Konstrukt C und D auch eine Aktivitätserhöhung bei unstimulierten Zellen bezogen auf Konstrukt C bzw. D ohne Kotransfektion.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus  $n > 4$  unabhängigen Experimenten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, bezogen auf Konstr. C ohne E2 mit  $p \leq 0,002$  bzw. D ohne Stimulation mit  $p \leq 0,02$  (außer Konstrukt D mit ER $\alpha$  ohne E2, nicht signifikant).



Die Induktionsverstärkung durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  war bei Konstrukt C unter 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol etwa doppelt so stark wie bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  (vgl. Abb. 4.3-8 **A**). Die Luciferaseaktivität des Konstrukts D unterschied sich bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  nicht signifikant von der Aktivität bei ER $\beta$ -Kotransfektion (vgl. Abb. 4.3-8 **B**).

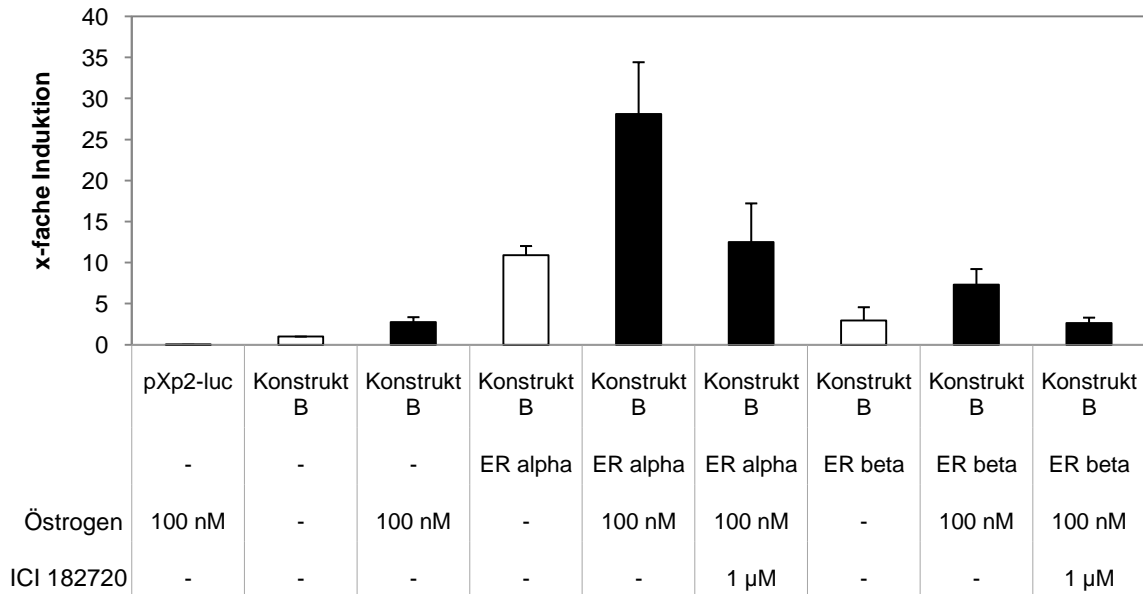
Die anhand von Konstrukt C und D untersuchte, weitgehend über SRE vermittelte Induktionswirkung des Östrogens um einen mittleren Wert von ca. 6 ließ sich also durch Kotransfektion beider Östrogenrezeptoren noch deutlich erhöhen.

#### 4.3.5 Bedeutung der ERE im Vergleich zu den serumresponsiven Elementen (SRE) für die Egr-1-Induktion in Abhängigkeit der Östrogenrezeptoren

Nachdem sich beim Vergleich der östrogenvermittelten Induktion von Konstrukt B (vornehmlich Vermittlung über ERE-halbsites und AP-1 sites) zum vollständigen Egr-1-Promotor eine unerwartet geringe Wirkung des Östrogens gezeigt hatte (vgl. Abb. 4.3-5), stellte sich die Frage, ob dies möglicherweise auf die Wirkung eines der beiden Östrogenrezeptoren zurückzuführen sei.

Die transiente Transfektion des Konstrukts B in neonatale Kardiomyozyten wies unstimuliert bei einer Inkubationszeit von 24 h eine nur 10%ige Luciferaseaktivität im Vergleich zum unstimulierten vollständigen Egr-1-Promotor auf (vgl. Abb. 4.3-5 **A**), die 18stündige Stimulation mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol ließ lediglich eine Induktion um den Faktor 2,7 erkennen. Dies wies bereits daraufhin, dass die über ERE vermittelte Promotorinduktion bei Egr-1-luc in Herzmuskelzellen eher von untergeordneter Rolle zu sein schien.

Während bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  (im Verhältnis von 1/50 zu Konstrukt B) im Gegensatz zu den Konstrukten C und D nur eine geringfügige Induktionsverstärkung (Faktor 3) im Vergleich zum unstimulierten Konstrukt B ohne Kotransfektion zu erkennen war, stieg die Luciferaseaktivität von Konstrukt B unter Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  unstimuliert um den Faktor 10 (vgl. Abb. 4.3-9).



**Abb. 4.3-9: Induktion des Konstrukts B durch 17 $\beta$ -Östradiol und Induktionsverstärkung durch die Östrogenrezeptoren**

In neonatale Herzmuskelzellen wurde zu Konstrukt B, das lediglich ERE und keine SRE enthält, noch jeweils der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  in einer Menge von 1/50 des Konstrukts kotransfiziert und mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol  $\pm$  ICI 182780 (1  $\mu$ M) für 18 h inkubiert.

Die Luciferaseaktivität zeigte bezogen auf das unstimulierte Konstrukt B eine knapp 3fache Induktion durch Östrogen, die sich durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  bis auf den Faktor 28 steigern ließ. Dagegen konnte durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  lediglich eine Steigerung um den Faktor 7, also nur ein Viertel der ER $\alpha$ -Wirkung erzielt werden. Die Östrogeninduktion ließ sich jeweils durch Zugabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 wieder vollständig rückgängig machen.

Auch unstimulierte Zellen ließen sich durch Kotransfektion des ER $\alpha$  in ihrer Luciferaseaktivität um den Faktor 11 steigern, bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  hingegen erfolgte nur eine 3fache Steigerung.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n > 5$  unabhängiger Experimenten (außer den Werten ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  ohne E2, hier  $n=3$ ), bezogen auf Konstrukt B ohne Östrogen,  $p \leq 0,03$  außer Konstrukt B ohne E2 mit ER $\beta$  1/50 (keine Signifikanz). Zur Kontrolle wurde der Leervektor pXp2-luc herangezogen.

Unter Inkubation mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol für 18 h zeigte sich diese Tendenz noch deutlicher: bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  stieg die Promotoraktivität lediglich um den Faktor 8, bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  wurde der Faktor 28 erreicht.

Alle östrogenvermittelten Effekte ließen sich durch die gleichzeitige Zugabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 (1  $\mu$ M) wieder auf die Werte ohne Östrogen zurückführen.

Die bisher durchgeführte Promotorstudie legte die Vermutung nahe, dass die klassische östrogenvermittelte Geninduktion in Herzmuskelzellen über ERE-halbsites und flankierende AP-1 sites mit den endogen vorhandenen Östrogenrezeptoren im Herz ohne relevante Bedeutung für die Transaktivierung von Egr-1 ist.

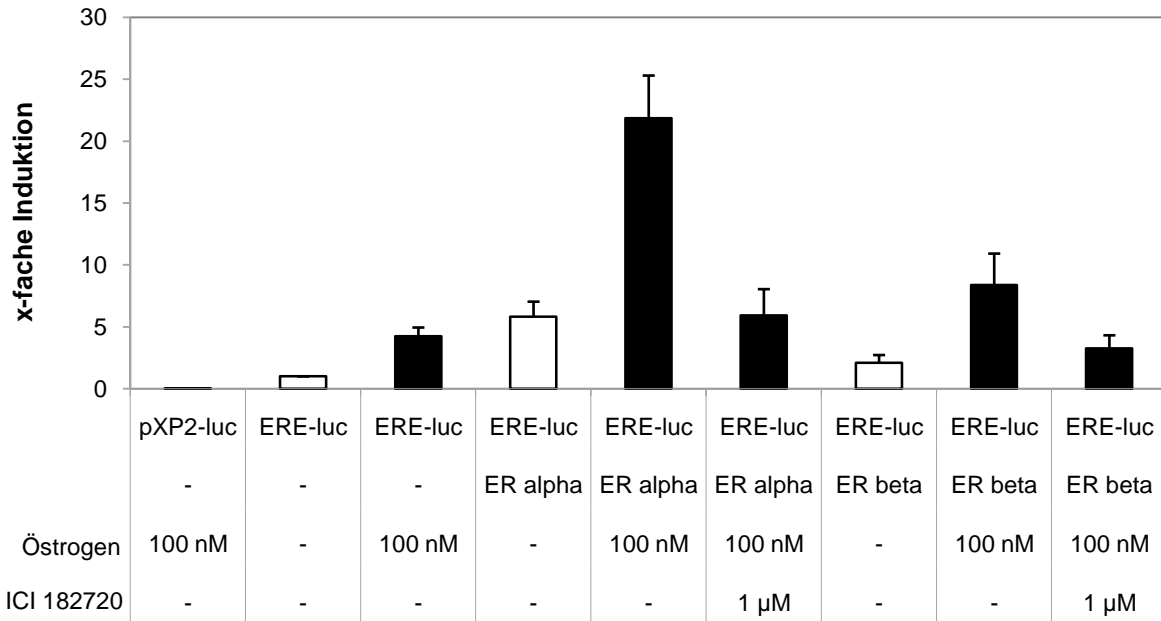
Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurde ein künstlicher Promotor namens ERE-luc verwendet, der aus zwei ERE-halbsites und Luciferase als Reporter gen zusammengesetzt ist.

In isolierte neonatale Kardiomyozyten wurde ERE-luc in einer Menge von 3  $\mu$ g pro Well eines 24er Wells transfiziert und nach 3 h für weitere 18 h mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol inkubiert. Die Kotransfektion der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  erfolgte in einem Verhältnis von 1/50 zur Gesamtmenge der transfizierten DNA. Zum Nachweis der selektiven Östrogenwirkung wurde zu der Östrogendosis von 100 nM der Östrogenrezeptorantagonist ICI 182780 (1  $\mu$ M) zugegeben.

ERE-luc ließ sich in Kardiomyozyten durch eine 18stündige Inkubation mit 100 nM Östrogen bezogen auf den unstimulierten Promotor um den Faktor 4 steigern (vgl. Abb. 4.3-10). Dieser Effekt konnte durch die Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  noch einmal verdoppelt werden (daraus resultiert in der Summe eine 8fache Gesamtinduktion).

Durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  in der gleichen Menge ließ sich ein bis zu 22facher Anstieg der Luciferaseaktivität beobachten, was einem knapp 3fachen Effekt des Östrogenrezeptors ER $\beta$  entspricht. Alle östrogeninduzierten Aktivitätssteigerungen waren durch die zusätzliche Inkubation des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 vollkommen reversibel.

Auch die Kotransfektion der beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  bei unstimulierten Zellen unterschied sich deutlich: während bei ER $\beta$  keine signifikante Steigerung (Faktor 2) erkennbar war, stieg bei ER $\alpha$  die Aktivität von ERE-luc im Vergleich zum Promotor ohne Kotransfektion deutlich um den Faktor 6 an.



**Abb. 4.3-10: Induktion von ERE-luc durch 17β-Östradiol und Induktionsverstärkung durch die Östrogenrezeptoren**

Nach transienter Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten mit ERE-luc, einem künstlichen Promotor aus ERE-halfsites, wurde mit 100 nM 17β-Östradiol ± ICI 182780 (1 μM) für 18 h inkubiert. Zur Darstellung der selektiven Östrogenrezeptorwirkung wurde jeweils der Östrogenrezeptor ERα bzw. ERβ im Verhältnis von 1/50 zu ERE-luc kotransfiziert.

Im Vergleich zum unstimulierten Promotor ließ durch die Inkubation mit 100 nM Östrogen eine 4fache Steigerung der Luciferaseaktivität feststellen, durch gleichzeitige Kotransfektion des Östrogenrezeptors ERβ ließ sich die Induktion unter 100 nM Östrogen nur um den Faktor 2 auf eine gesamte 8fache Steigerung erhöhen. Dagegen stieg die Induktion durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ERα in gleicher Menge um mehr als das 5fache auf einen Faktor von 22 (bezogen auf den unstimulierten Promotor) an. Diese Effekte ließen sich jeweils wieder mit dem Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 vollständig zurückführen. Auch bei unstimuliertem Promotor unterschied sich die Kotransfektion des Östrogenrezeptors ERα durch eine höhere Induktionswirkung im Vergleich zu ERβ (Faktor 6 bei ERα, bei ERβ lediglich Faktor 2).

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus n > 6 unabhängiger Experimenten, bezogen auf ERE-luc ohne Östrogen, p ≤ 0,02 außer ERE-luc ohne E2 mit ERβ 1/50 (p ≤ 0,05).

Zur Kontrolle wurde der Leervektor pXp2-luc herangezogen.

Das Induktionsverhalten von Konstrukt B war, wie aus den Abb. 4.3-9 und 5.5-8 im Vergleich ersichtlich, dem des künstlichen Promotors ERE-luc nahezu identisch. Besonders bei Konstrukt B war eine Induktion durch 100 nM Östrogen nur in sehr

geringem Maße möglich (Faktor 2, vgl. Abb. 5.5-8). Auf der anderen Seite konnte eine extrem hohe Aktivitätssteigerung um den Faktor 20 (bzw. Faktor 28 bei Konstrukt B) bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  beobachtet werden, während die Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  nur etwa ein Drittel der Wirkung von ER $\alpha$  erbrachte.

Die Ergebnisse aus dem Induktionsverhalten von Konstrukt B und Konstrukt C bzw. D durch 17 $\beta$ -Östradiol verglichen mit dem vollständigen Egr-1-Promotor wiesen auf einen ungewöhnlichen Induktionsweg des Östrogens in Kardiomyozyten hin. Der klassische Induktionsweg des Östrogens über die östrogenresponsiven Elemente, wie bei Konstrukt B mit 2 ERE-halbsites mit flankierenden AP-1-sites, spielt ofenkundig bei der Induktion von Egr-1 in Herzmuskelzellen keine relevante Rolle. Im Gegensatz dazu erfolgt eine deutliche Induktion über die serumresponsiven Elemente des Promotors.

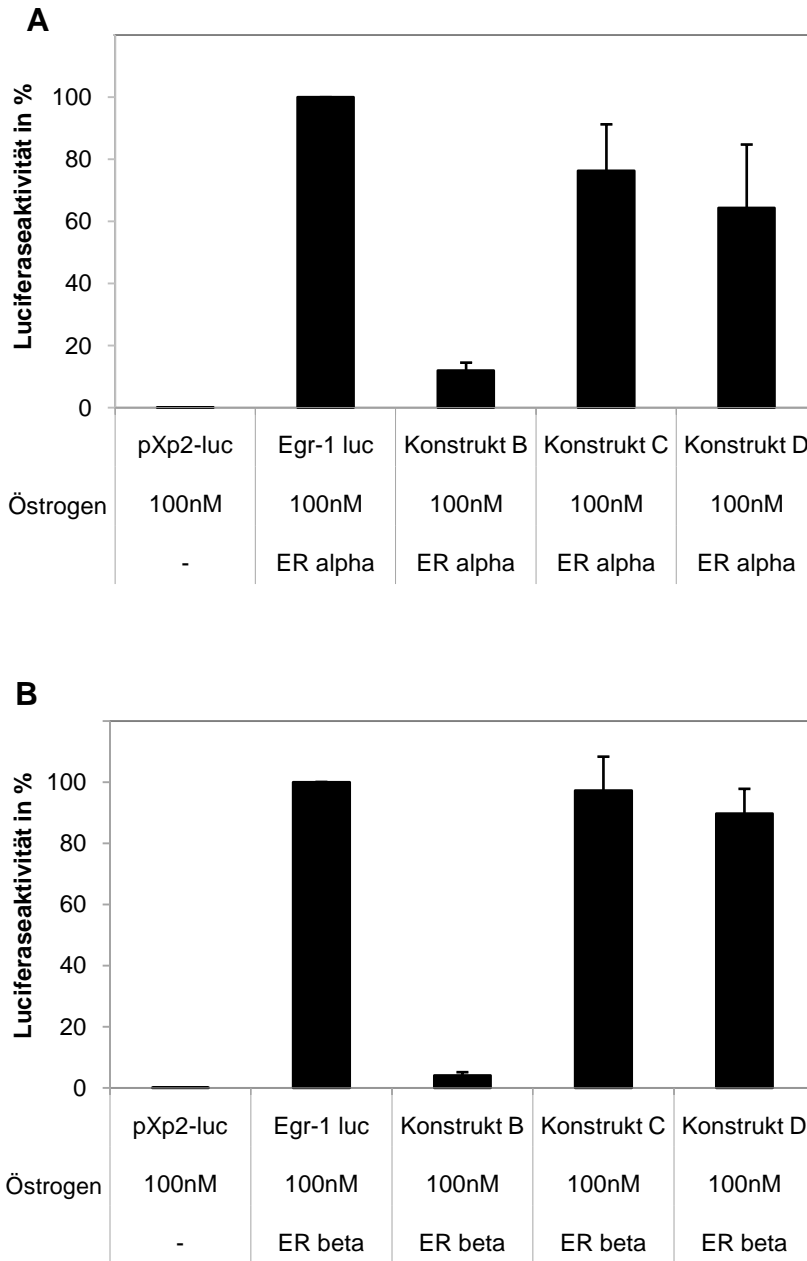
Da jedoch Konstrukt B nach Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  ebenfalls eine hohe Induktion aufwies, sollte die Aktivität der SRE-enthaltenden Konstrukte C und D mit dem aus 2 ERE plus flankierenden AP-1 sites bestehenden Konstrukts B gegen den vollständigen Promotor unter Kotransfektion der Östrogenrezeptoren verglichen werden.

Dazu wurden in neonatale Kardiomyozyten transient zum jeweiligen Konstrukt (A – D) in einer Gesamtmenge von 2  $\mu$ g DNA der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  in einem Mengenverhältnis von 1/50 bezogen auf die Plasmidmenge des Reportergens kotransfiziert. Die Zellen wurden für 18 h mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol inkubiert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen.

Alle Werte wurden auf Egr-1-luc mit 100 nM Östrogen und kotransfiziertem Östrogenrezeptor ER $\alpha$  (Abb. 4.3-11 **A**) bzw. ER $\beta$  (Abb. 4.3-11 **B**) bezogen und als Prozentwerte angegeben.

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Luciferaseaktivität des Konstrukts B sowohl unter Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  als auch unter ER $\beta$ . Während allerdings bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  nur noch eine 4%ige Luciferaseaktivität des Konstrukts B im Vergleich zu Egr-1-luc vorhanden war, lag die Aktivität bei ER $\alpha$  immerhin noch bei 12% der Aktivität des kompletten Promotors.

Der Vergleich der Luciferaseaktivität zwischen Konstrukt C bzw. D und dem kompletten Promotor ergab keinen signifikanten Unterschied, auch wenn tendenziell die Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  insgesamt etwas höhere Werte erreichte.



Neonatale Kardiomyozyten wurden mit Egr-1 bzw. dem jeweiligen Konstrukt zusammen mit dem Östrogenrezeptor ER $\alpha$  (Abb. A) bzw. ER $\beta$  (Abb. B) im Verhältnis von 1/50 der DNA-Menge des Konstrukts transfiziert und anschließend mit 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol für 18 h inkubiert.

Konstrukt B (im Wesentlichen aus ERE bestehend) erreichte bei Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\beta$  lediglich 4% der Aktivität von Egr-1-luc, mit ER $\alpha$  immerhin noch 12%.

Die beiden SRE-enthaltenden Konstrukte C und D unterschieden sich in ihrer Luciferaseaktivität nicht signifikant von Egr-1-luc.

Darstellung Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n > 5$  (Abb. A) bzw.  $n > 9$  (Abb. B) unabhängigen Experimenten, die Aktivität des im Wesentlichen ERE-enthaltenden Konstrukts B jeweils hochsignifikant niedriger als Egr-1-luc mit  $p < 0,0001$ , sonst keine signifikanten Unterschiede.

**Abb. 4.3-11:** Luciferaseaktivität der Konstrukte mit kotransfiziertem Östrogenrezeptor

Die Induktion des Egr-1-Promotors durch 100 nM 17 $\beta$ -Östradiol erfolgt in Herzmuskelzellen also vorwiegend über die SRE des Promotors (Konstrukt C und D), wobei hier die ersten vier die entscheidende Rolle zu spielen schienen (Konstrukt D). Auch mit sehr kurzen Promotorausschnitten (Konstrukt D: 287 bp) ließ sich unter Kotransfektion der Östrogenrezeptoren nahezu die volle Luciferaseaktivität des kompletten Promotors (Vergleich bei gleicher Östrogenrezeptor-Kotransfektion) erreichen.

Eine relevante Induktion über die ERE ist nur unter Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  möglich (vgl. die Ergebnisse der Kotransfektion bei Konstrukt B und ERE-luc), der endogene Rezeptorstatus der Herzmuskelzellen ermöglicht nur eine sehr geringe Induktion über östrogenresponsive Elemente.

Da sich die östrogenvermittelte Promotorinduktion von Egr-1 durch Erhöhung der Östrogenrezeptormenge steigern ließ und damit ein rezeptorabhängiger Mechanismus zugrunde liegen musste, aber gleichzeitig nicht der klassische Induktionsweg über östrogenresponsive Elemente (ERE) vorlag, sollte eine weitergehende Analyse die Östrogenwirkung über serumresponsive Elemente (SRE) klären.

#### 4.3.6 Die östrogenabhängige Geninduktion des Egr-1-Promotors erfolgt durch Proteinbindung an serumresponsive Elemente (SRE) unter Beteiligung des Serumfaktors

Nukleäre Extrakte aus isolierten neonatalen Kardiomyozyten nach Östrogenbehandlung (10 nM über 15 Minuten) gegenüber östrogenfreiem Medium wurden für Gelshift-Assays (EMSA) zur Untersuchung der Proteinbindung an serumresponsive Elemente des Egr-1-Promotors verwendet. Oligonukleotide, bestehend aus den Sequenzen der SRE-Bindungsstellen der SRE 3-6 des Egr-1-Promotors, wurden mit radioaktivem <sup>32</sup>P markiert und zum Nachweis einer Protein-/DNA-Komplexbildung eingesetzt.

Folgende SRE-Oligonukleotide wurden für Gelshift-Assays verwendet:

SRE	bp	mism	SRE-Seq (5'-3')	Oligonukleotidsequenz
6	-671 bis -661	2	CCATATAAGG	5'-TTAAACG <u>CCATATAAGG</u> AGCAG-3'
5	-633 bis -623	1	CCTTATTTGG	5'-TTACAGA <u>CCTTATTTGG</u> GCAGC-3'
4	-617 bis -607	0	CCTTATATGG	5'-TTCAGCG <u>CCTTATATGG</u> AGTGG-3'
3	-602 bis -592	2	CCCAATATGG	5'-TTAGTGG <u>CCCAATATGG</u> CCCTG-3'

**Tab. 4.3-1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für Gelshift-Assays**

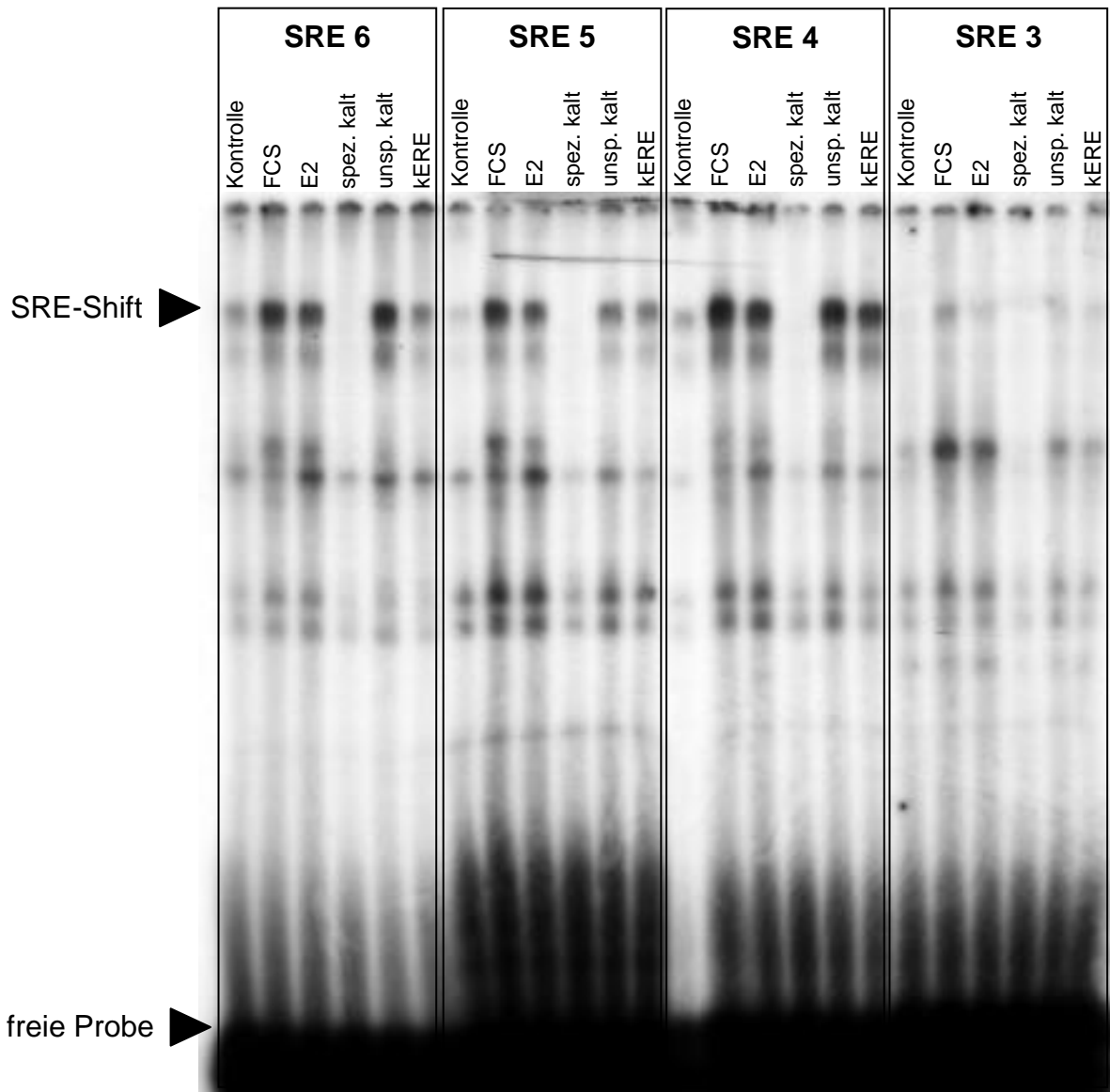
In der ersten Spalte findet sich die Bezeichnung der einzelnen SRE (vgl. Promotorkarte von Egr-1), die zweite Spalte (bp) gibt die Basenpaare im Egr-1-Promotor wieder. Spalte 3 (mism) zeigt die Zahl der mismatches zur optimalen CArG-Box an, in der vierten Spalte (SRE-Seq) ist die SRE-Sequenz unter kursiver Schrift der mismatches angegeben. Die letzte (rechte) Spalte gibt die vollständige Oligonukleotidsequenz wieder.

Während bei unstimulierten Kardiomyozyten nur ein minimaler Shift als Ausdruck eines Protein-/DNA-Komplexes bei den SRE 3-6 zu detektieren war, zeigte sich eine zur Positivkontrolle mit Fötalem Kälberserum (FCS) gleichwertige Shiftbildung durch eine kurzzeitige Östrogenbehandlung (15 min) in niedriger Östrogendosis (10 nM). Die spezifische Bindung des Proteinkomplexes an die SRE-Sequenzen konnte durch die Aufhebung des Effektes bei Zugabe des jeweiligen unmarkierten Oligonukleotids im Überschuss bewiesen werden. Die Applikation eines ungelabelten ERE-Oligonukleotids hatte keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten an den SRE-Oligonukleotiden.

Die SRE 6-4 zeigten eine gleich starke Protein-/DNA-Komplexbildung, wohingegen SRE 3 ein deutlich abgeschwächtes Bindungsverhalten aufwies.

Damit konnte die schnelle Induktion eines Protein-/DNA-Komplexes an SRE durch Östrogen gezeigt werden, die dem schnellen Effekt durch Serum vergleichbar in Bezug auf Ausprägung und Zeitverlauf war.





**Abb. 4.3-12: Östrogenabhängige Proteinbindung an die SRE-Bindungsstellen des Egr-1-Promotors**

Nukleäre Extrakte aus Isolierten neonatale Herzmuskelzellen unter Behandlung mit 10 nM 17 $\beta$ -Östradiol für 15 min wurden für die Herstellung der Gelshifts verwendet. <sup>32</sup>P-gelabelte Oligonukleotide mit den Sequenzen der vier upstream-gelegenen SRE des Egr-1-Promotors wurden eingesetzt, um Proteinbindungen an die SRE des Egr-1-Promotors nachzuweisen.

Die 15minütige Östrogenbehandlung zeigte einen zur Positivkontrolle mit Fötalem Kälberserum gleichartigen DNA-shift durch Proteinanbindung an die SRE. Als Positivkontrolle dienten nukleäre Extrakte nach Behandlung mit Fötalem Kälberserum (20%iges FCS) über 60 min. Alle verwendeten Oligonukleotide mit den Sequenzen der SRE 3,4,5 und 6 des Egr-1-Promotors führten zu einer Proteinkomplexbildung unter Östrogen und FCS. Die schwächste Proteinkomplexbildung fand sich beim am weitesten downstream gelegenen SRE (SRE 3). Der Effekt ließ sich durch Zugabe von ungelabelten spezifischen Oligonukleotiden (sk – spezifisch kalt) vollständig aufheben (Negativkontrolle). Unmarkierte unspezifische Oligonukleotide (unsp. kalt) hatten wie unmarkiertes ERE-Oligonukleotid (kERE) keinen Einfluss auf die Shiftbildung.

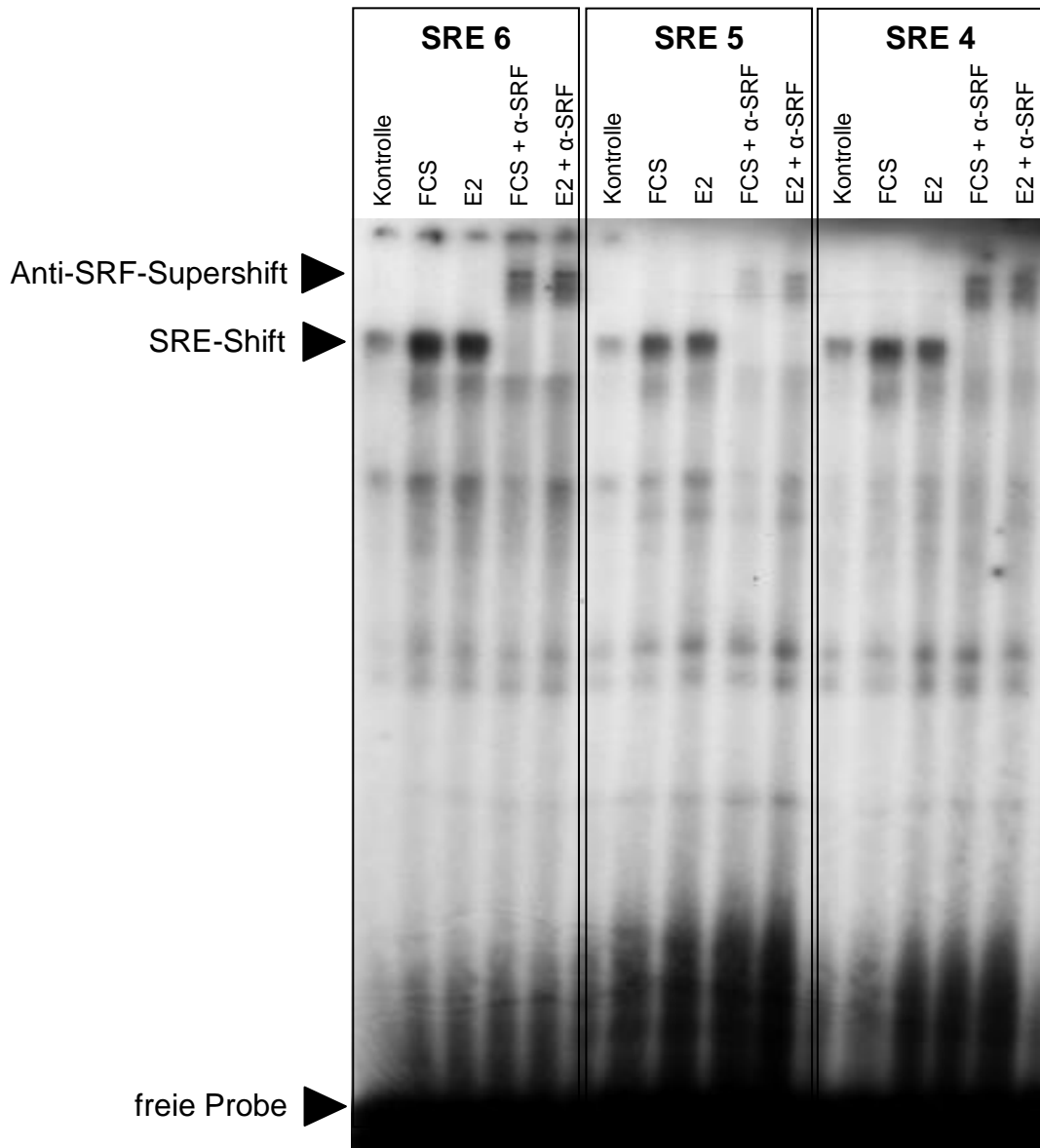
Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 7 voneinander unabhängig durchgeführten Gelshift-Assays.

Bei nun erfolgtem Nachweis einer durch kurzzeitige Inkubation mit 10 nM Östrogen ausgelösten Protein-/DNA-Komplexbildung an serumresponsive Elemente des Egr-1-Promotors stellte sich die Frage nach den beteiligten Transkriptionsfaktoren und die Frage nach einer etwaigen direkten Beteiligung des Östrogenrezeptors.

Da unter Östrogen ein gleicher Shift der SRE-Bindungsstellen wie bei fötalem Kälberserum (FCS) zu erzielen war, lag die Vermutung nahe, dass an der Komplexbildung der serum responsive factor (SRF) mitbeteiligt war.

Hierzu wurden die Gelshift-Assays zusätzlich mit einem polyklonalen Antikörper gegen SRF durchgeführt. Durch den Anti-SRF-Antikörper konnte im durch Östrogen induzierten Protein-/DNA-Komplex an den SRE-Bindungsstellen Serumfaktor nachgewiesen werden, bzw. ein Protein mit gleicher Antigenität (Nachweis durch erneutes „Shiften“ des Shifts, sog. Supershift, vgl. Abb. 4.3-13). Dieser Effekt ließ sich an allen serumresponsiven Elementen des Egr-1-Promotors nachweisen, wobei der am weitesten downstream gelegene SRE-Komplex die schwächste Proteinkomplexbildung aufwies.

Bei der östrogenvermittelten schnellen Aktivierung des Egr-1-Promotors zeigte sich eine Serumfaktorbindung an die serumresponsiven Elemente des Promotors, eine Bindung des Östrogenrezeptors an den Transkriptionskomplex konnte nicht nachgewiesen werden (kein Supershift unter Verwendung des Östrogenrezeptorantikörpers anti-ER $\alpha$  und anti-ER $\beta$ ).



**Abb. 4.3-13: Östrogenabhängige SRF-Bindung an die SRE-Bindungsstellen des Egr-1-Promotors**

Nukleäre Extrakte aus Isolierten neonatale Herzmuskelzellen unter Behandlung mit 10 nM 17β-Östradiol für 15 min wurden für die Herstellung der Gelshifts verwendet. <sup>32</sup>P-gelabelte Oligonukleotide mit den Sequenzen der vier upstream-gelegenen SRE des Egr-1-Promotors wurden benutzt, um Proteinbindungen an die SRE des Egr-1-Promotors nachzuweisen. Zusätzlich wurde ein polyklonaler Antikörper gegen SRF (serum response factor) eingesetzt.

Unter Einsatz des Anti-SRF-Antikörpers zeigte sich das Phänomen eines Supershifts sowohl bei FCS-behandelten Kardiomyozyten als auch bei den mit Östrogen 10 nM über 15 min inkubierten Zellen. Als Positivkontrolle dienten nukleäre Extrakte nach Behandlung mit Fötalem Kälberserum (FCS 20%) über 60 min. Der bei allen verwendeten SRE-Oligonukleotiden (Sequenzen der SRE 3, 4, 5 und 6 des Egr-1-Promotors) durch den Anti-SRF-Antikörper (α-SRF) hervorgerufene Supershift belegte die Bindung von SRF an die SRE-Bindungsstelle (oder eines Proteins mit gleicher Antigenität wie SRF). Die schwächste Proteinkomplexbildung fand sich beim am weitesten downstream gelegenen SRE (SRE 3) – nicht gezeigt.

Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 5 voneinander unabhängig durchgeführten Gelshift-Assays.

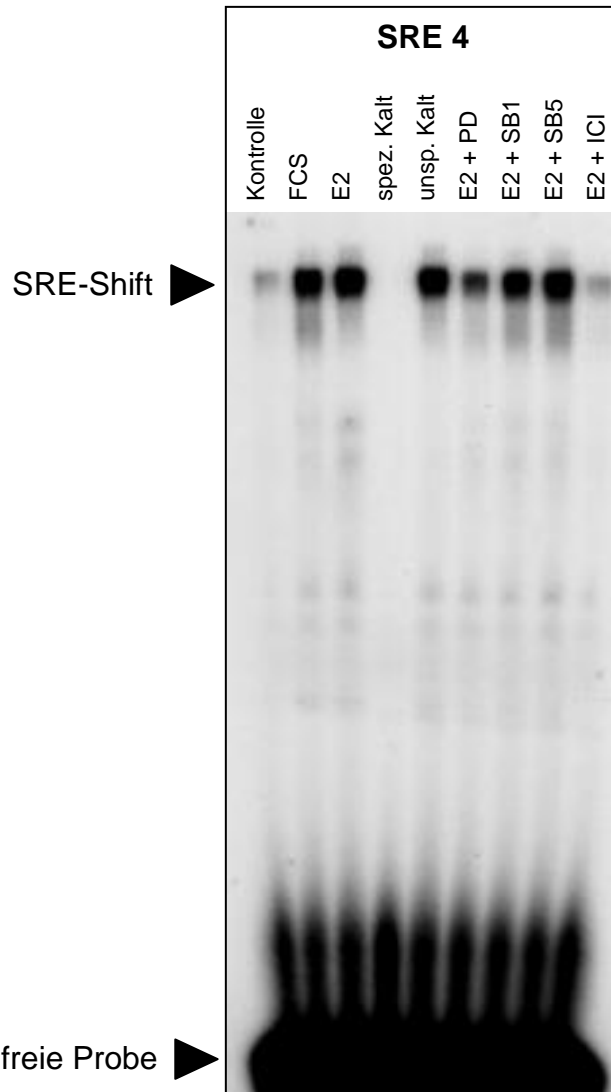
Um den Nachweis einer östrogenabhängigen Bindungsverhalten an die SRE-Bindungsstellen des Egr-1-Promotors führen zu können und einen Hinweis auf mögliche Signalkaskaden der schnellen Östrogenwirkung zu erhalten, wurden Gelshift-Assays mit verschiedenen Antagonisten angewendet.

Hierbei ließ sich die Östrogenspezifität beweisen, indem der Östrogenrezeptorantagonist ICI 182780 die Bildung des Protein-/DNA-Komplexes am serumresponsiven DNA-Element (SRE) vollständig aufhob.

In gleicher Weise wurde durch den MEK-Inhibitor PD 98059 die Proteinbindung am SRE vollständig verhindert.

Im Gegensatz dazu zeigten der P38-MAPK-Inhibitor SB 202190 wie auch der Inhibitor SB 203580 keinen Effekt auf die Shiftbildung der SRE.

Die östrogenvermittelte Transaktivierung über SRE des Egr-1-Promotors erfolgt also über die Signalkaskade mit ERK1/2 (p42/p44) und greift nicht auf den p38 MAPK-vermittelten Signalweg zurück.



**Abb. 4.3-14: Östrogenabhängige SRF-Bindung an die SRE-Bindungsstellen des Egr-1-Promotors**

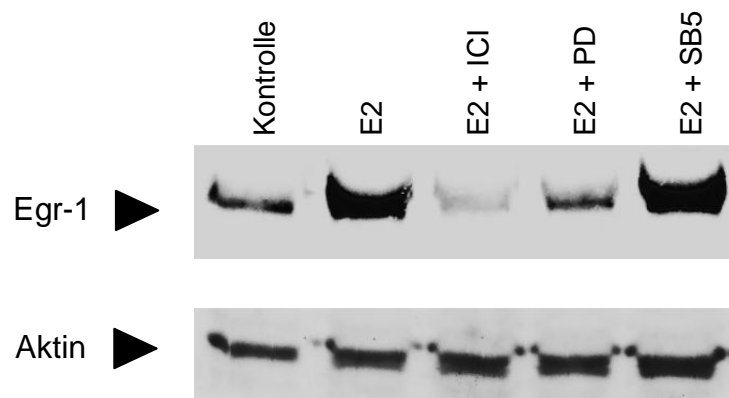
Nukleäre Extrakte aus Isolierten neonatale Herzmuskelzellen unter Behandlung mit 10 nM 17 $\beta$ -Östradiol für 15 min wurden für die Herstellung der Gelshifts verwendet. <sup>32</sup>P-gelabelte Oligonukleotide mit den Sequenzen der vier upstream-gelegenen SRE des Egr-1-Promotors wurden benutzt, um Proteinbindungen an die SRE des Egr-1-Promotors nachzuweisen. Exemplarisch ist das Bindungsverhalten an SRE 4 des Egr-1-Promotors dargestellt. Bei kurzer Östrogeninkubationszeit (10 nM über 15 min) zeigte sich ein SRE-Shift als Zeichen der östrogeninduzierten Protein-/DNA-Bindung an SRE. Als Positivkontrolle dienten nukleäre Extrakte nach Behandlung mit Fötalem Kälberserum (FCS 20%) über 60 min. Die spezifische Bindung wurde durch die Aufhebung durch spezifisch ungelabelte Oligonukleotide (spezifisch kalt) nachgewiesen, der Östrogeneffekt ließ sich durch gleichzeitige Zugabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 vollständig blockieren. Der P38-MAPK-Inhibitor SB 202190 wie auch der Inhibitor SB 203580 hatten keinen Einfluss auf die östrogeninduzierte Proteinbindung an SRE. Dagegen fand sich bei gleichzeitiger Inkubation mit dem MEK-Inhibitor PD 98059 eine Abschwächung der Östrogenwirkung.

Die schwächste Proteinkomplexbildung fand sich beim am weitesten downstream gelegenen SRE (SRE 3), Daten nicht gezeigt. Die schnelle östrogenvermittelte SRE-Bindung wird nicht über die p38-Signalkaskade vermittelt, sondern erfolgt über die Kinasen ERK1/2.

Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 6 voneinander unabhängig durchgeführten Gelshift-Assays.

Um die östrogenaktivierte Produktion von Egr-1 als Endprodukt der Geninduktion unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse des Signalwegs über serumresponsive Elemente unter Bindung von serum response factor (SRF) darzustellen, wurde Egr-1 auf Proteinebene mittels Western Blot in Abhängigkeit von Östrogen und Antagonisten bzw. MAP-Kinaseinhibitoren untersucht. Hierzu wurden isolierte primäre Kardiomyozyten über 90 min mit Östrogen (10 nM) behandelt und mit dem Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 (1 µM) oder mit PD 98059 als ERK1/2-Inhibitor oder dem p38 MAPK-Inhibitor SB 202190 verglichen. Durch die Östrogenbehandlung zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Egr-1-Proteins im Vergleich zu unbehandelten Kardiomyozyten.

Unter gleichzeitiger Gabe von ICI 182780 wurde der Östrogeneffekt aufgehoben, in gleicher Weise wurde die Östrogenwirkung durch den ERK1/2-Inhibitor PD 98059 gehemmt. Eine Hemmung der p38 MAPKinase zeigte dagegen keine Wirkung (Abb. 4.3-15).



**Abb. 4.3-15: Die spezifische östrogeninduzierte Egr-1-Proteinexpression ist über den Signalweg der ERK1/2-Kaskade und nicht über p38 MAPKinase vermittelt**

Gesamtproteinextrakte aus isolierten neonatalen Herzmuskelzellen unter Behandlung mit 10 nM 17β-Östradiol für 90 min wurden zur Herstellung der Western blots verwendet. Unter Östrogenbehandlung stieg die Egr-1-Proteinexpression stark an. Dieser Effekt ist östrogenspezifisch, da er durch die zusätzliche Behandlung mit dem Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 (1 µM) aufgehoben wird. Bei gleichzeitiger Hemmung der ERK1/2-Kinase bewirkte Östrogen keine Proteinexpression von Egr-1. Die Hemmung der p38 MAPKinase zeigte dagegen keinen Effekt. Die Aktinbande diente als Ladungskontrolle zum Vergleich. Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 voneinander unabhängig durchgeführten Western blots.

Damit zeigte sich die postulierte östrogenabhängige Induktion von Egr-1 in Herzmuskelzellen über ERK1/2 bestätigt, während die Signalkaskade über p38 MAPKinase ohne Bedeutung für die östrogenabhängige Regulation von Egr-1 ist.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Fragestellung nach dem molekularen Mechanismus der östrogeninduzierten Genexpression in Herzmuskelzellen am Beispiel des Zielgens Egr-1. Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene Transfektionssysteme an neonatalen Kardiomyozyten evaluiert, wobei sich lediglich das Adenovirus-gestützte System zur transienten Transfektion als zuverlässiges System herausstellte. Im zweiten Teil wurde im Rahmen einer Promotorstudie der schnelle Östrogeneffekt auf Egr-1 untersucht. Hierbei fand sich ein neuartiger Geninduktionsweg, der über die serumresponsiven Elemente (SRE) und nicht wie erwartet über östrogenresponsive Elemente (ERE) des Promotors zur schnellen Geninduktion von Egr-1 führt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die schnelle Östrogenwirkung durch die Bindung des Serumfaktors an SRE unter Mitbeteiligung der Kinasen ERK1/2 erfolgt, wobei eine Beteiligung der p38 MAPK keine Rolle spielt.

### 5.1 *Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten*

Das transiente wie auch permanente Einbringen von DNA in eukaryote Zellen (Transfektion) stellt mit zunehmender Differenzierung und Spezialisierung der Zelle ein ausgesprochenes Problemfeld dar.

Während bei einfachen Zellsystemen wie z.B. bei bestimmten Bakterienstämmen allein durch Zugabe von DNA (in unbehandelter Form oder gekoppelt an einen Trägerstoff) eine Aufnahme von Fremd-DNA erfolgt, lassen sich hochdifferenzierte Zellen wie Kardiomyozyten nur mit komplizierten Methoden zur DNA-Aufnahme und Transkription der eingebrachten Plasmide motivieren (van der Aa et al. 2006). Herzmuskelzellen zählen seit langem zu den am schwierigsten zu transfizierenden Zellarten (Bauer et al. 2005).

Zur Untersuchung von Regulationsmechanismen der Genexpression stellt die Transfektionstechnik allerdings eine wichtige Voraussetzung dar, da hiermit das Einbringen von DNA mit spezifischen Promotorelementen und damit gezielte Untersuchungen einzelner Genbestandteile erst möglich werden.

Für die Transfektion von Herzmuskelzellen sind zahlreiche Methoden vorhanden, jedoch ist die Effizienz der meisten Verfahren niedrig (< 10%) und zudem durch eine große Schwankungsbreite schlecht vergleichbar.

Eine Ausnahme stellt die Transfektion mit Hilfe von Adenoviren dar, die durch eine rezeptorvermittelte Ankopplung der Adenoviren an die Zellmembran eine hohe Aufnahme rate der Adenoviren in die Zielzelle garantiert (Meidell et al. 1992). Mit zunehmender Rezeptordichte erhöht sich die Aufnahme rate der Adenoviren mit der Folge einer höheren Transfektionsrate (Huang et al. 1995).

Mit der Entwicklung genetisch veränderter Adenoviren (Reduktion der Replikationsfähigkeit, Veränderung der Oberflächenstruktur) konnten zunehmend Fortschritte bei der Transfektion von adulten (Stratford-Perricaudet et al. 1992; Kirshenbaum et al. 1993) wie auch neonatalen Kardiomyozyten (Kass-Eisler et al. 1993) erzielt werden. Neben dem adenoviralen Gentransfer in Herzmuskelzellen *in vitro* wurden in den folgenden Jahren auch erfolgreiche Transfektionen am Myokard *in vivo* vorgenommen (Zhang et al. 1999; Barr et al. 1994).

Bei fester Integration der zu transfizierenden DNA in das Virusgenom (adenoviraler Vektor) können mit den entsprechenden Vektoren Transfektionsraten von ca. 90% an Kardiomyozyten erzielt werden (Kirshenbaum et al. 1993). Aufgrund des großen technischen und zeitlichen Aufwandes zur Herstellung von Adenoviren mit fest integrierten Plasmiden in der Virus-DNA (sog. Vektoren) ist die Untersuchung einer größeren Menge verschiedener DNA-Plasmide, wie dies bei einer Promotorstudie zur Untersuchung einzelner DNA-Sequenzen erforderlich ist, mit dieser Methode kaum realisierbar.

Zu Beginn der viralen Transfektion bestand des Weiteren das Problem, dass unter Verwendung von Adenoviren eine maximale DNA-Größe von 7,5 kb als zusätzliche DNA in das Virusgenom eingebracht werden konnte, da ansonsten eine Virusschädigung verursacht wurde (Bett et al. 1993). Mit der aktuellen Entwicklung von sogenannten „high-capacity-Adenoviren“ (HC-Ad) lässt sich Fremd-DNA bis zu einer Größe von 36 kb transfizieren (Biermann et al. 2001).

Einen alternativen Transfektionsweg stellt die adenoviral gestützte Transfektion von Herzmuskelzellen dar, die unter Zuhilfenahme chemisch oder genetisch inaktivierter Viren die lytischen Eigenschaften der Virusoberfläche zur Auflösung der Endosomen



nutzt (Cotten et al. 1992). Hierzu werden die zu transfizierenden DNA-Plasmide mit ihrer negativen Nettoladung über einen positiven Trägerstoff an das wiederum negativ geladene Adenovirus gekoppelt (Kohout et al. 1996). Diese Methode, die erstmalig von den Arbeitsgruppen Wagner und Curiel 1994 beschrieben wurde (Michael, Curiel 1994), zeigte nach Systemoptimierung unter Verwendung von Poly-L-Lysin als positiven Ladungsträger eine stabile Transfektionseffizienz, wodurch eine Promotorstudie an Herzmuskelzellen ermöglicht wurde.

Im Gegensatz zur Transfektion von in das Virusgenom eingebauter DNA gefährden bei einem Mehrkomponentensystem (wie bei dem in dieser Arbeit verwendeten Polylysin-Adenovirus-System) mehrere unsichere Faktoren den Transfektionserfolg. So ist für die Komplexbildung aus dem positiv geladenen Trägerstoffes wie Poly-L-Lysin und der negativ geladenen Plasmid-DNA ein passendes Mengenverhältnis essentiell, um möglichst ein Konglomerat von DNA-Plasmiden bei einem zu geringen Mengenverhältnis zu Polylysin zu vermeiden und zu einer möglichst hohen Zahl an DNA-Polylysin-Komplexen zu gelangen (Vijayanathan et al. 2002).

Im Rahmen dieser Komplexbildung entstehen je nach Stoffeigenschaften in Interaktion mit den Plasmiden unterschiedlich große Poly-DNA-Aggregate (Wagner et al. 1991), die mit zunehmender Größe nicht mehr transfektionsfähig sind (Stanić et al. 2008). Typischerweise kondensiert Polylysin die Plasmid-DNA in 80-100 nm große Strukturen, die sich bei im Gesamtkomplex (DNA-Polylysin) ausgebildeter positiver Nettoladung über den positiven Ladungsträger Poly-L-Lysin an die negativ geladene Adenovirushülle anheften können (Curiel et al. 1991).

Neben dem Mengenverhältnis von Polykation (wie Polylysin) zu DNA-Plasmid scheinen auch die primären Eigenschaften der Katione einen Einfluss auf Umfang und Form (Torioide oder „rods“) der DNA-Kondensation eine Rolle zu spielen (Krasinski et al. 1997).

Die Aufnahmerate von Adenoviren in Herzmuskelzellen ist durch das Andocken der Viren an spezifische Rezeptoren der Zielzelle sehr hoch. Abhängig von der Rezeptorexpression weisen adulte Myozyten im Vergleich zu jüngeren Muskelzellen eine deutlich verminderte Virusaufnahme auf (Acsadi et al. 1994). Insbesondere neonatale Kardiomyozyten zeichnen sich durch eine deutliche Expression des 1997

klonierten Coxsackie- und Adenovirusrezeptors (CAR) aus, ein 47 kDa großes transmembranäres Protein (He et al. 2001), über das eine rezeptorvermittelte hohe Aufnahmerate von Adenoviren erfolgt (Bergelson et al. 1997; Tomko et al. 1997; Bergelson et al. 1998; Poller et al. 2002).

Unterstützt wird die Virusaufnahme durch Hilfsproteine aus der Gruppe der Integrine, bei Adenoviren sind besonders alpha(v)beta(3)- sowie alpha(v)beta(5)-Integrine von Bedeutung (Mathias et al. 1994; Huang et al. 1995). Insbesondere der Subtyp alpha(v)beta(5) scheint bei der Permeabilisierung der Zellmembran durch Adenoviren eine große Rolle zu spielen (Wickham et al. 1994; Mathias et al. 1994). Bai et al. konnten 1994 eine spezifische Erkennung von bestimmten Adenovirustypen durch alpha(v)beta(5)-Integrine an HeLa-Zellen zeigen (Bai et al. 1994). Offenbar korreliert die Expressionsgröße von alpha(v)beta(5)-Integrinen mit der Virus-Aufnahmefähigkeit eines Zellsystems (Takayama et al. 1998).

Eine Kolokalisation des CAR mit den alpha(v)beta(3)- und alpha(v)beta(5)-Integrinen konnte in der Zellmembran von humanen Kardiomyozyten nachgewiesen werden, wobei sich bei dilatativer Kardiomyopathie eine deutlich erhöhte Expression der Rezeptoren fand (Noutsias et al. 2001).

Neben ihrer physiologischen Bedeutung als an der Zelloberfläche befindliche Moleküle (Cohen et al. 2001) bei Herzmuskelzellen wie auch bei nichtkardialen Zellen für die Zell-Zell-Interaktionen und Informationsvermittler für mechanische und adrenerge Signalwege ist der Gruppe der Integrine eine wichtige Rolle bei der hypertrophen Antwort von Herzmuskelzellen zugeordnet (Ross et al. 1998). Weiterhin findet sich eine vermehrte CAR-Expression im Randgebiet ischämischer Myokardareale als Zeichen eines beginnenden kardialen Remodeling (Fechner et al. 2003).

Die spezifische rezeptorgekoppelte adenovirale Zellaufnahme stellt einen Ansatz für eine gezielte gewebsspezifische therapeutische Transfektion von erkrankten Zellen dar (Ghosh, Barry 2005).

Der Transfektionserfolg ist aber ebenso entscheidend von den anschließend intrazellulär ablaufenden Prozessen bei spezifischen Virus-Zell-Interaktionen abhängig (Defer et al. 1990).

Damit das in die Zelle erfolgreich eingebrachte Plasmid auch transkribiert werden kann, darf keine lysosomale oder spätere intrazelluläre Zerstörung des Plasmids stattfinden. Außerdem ist eine Aufnahme in den Zellkern erforderlich, die in der Regel nach ca. 35 Minuten nach Andocken der Adenoviren an die Zellmembran erfolgt ist (Chillon, Kremer 2001). In den Prozess der endosomalen Freigabe der Adenoviren als Voraussetzung der transkriptionellen Aktivität ist offenbar erneut der Subtyp alpha(v)beta(5) der Integrine involviert (Majhen et al. 2009).

Die hohe Effizienz der adenoviralen Transfektionsmethoden erklärt sich durch den effektiven Infektionsweg der Adenoviren, der aus der Fähigkeit zur Befreiung aus dem endosomalen Komplex und einer effektiven DNA-Übermittlung in den Zellkern resultiert (Meidell et al. 1992; Kirshenbaum et al. 1993).

Schließlich muss die eingebrachte DNA im Zellkern abgelesen werden, was zum einen von der Promotoraktivität des Plasmids und zum anderen von komplexen intranukleären Regulationsmechanismen abhängig ist. Daher werden zur Optimierung eines Transfektionsverfahrens hochaktive virale Promotoren wie z.B. der Promotor des Cytomegalievirus, der zu den stärksten Promotoren *in vitro* zählt (Boshart et al. 1985), eingesetzt (CMV-luc).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass allerdings trotz starker Promotoraktivität ein sogenanntes nukleäres silencing, also ein Stilllegen von Genen, im Zellkern stattfinden kann, das durch die Zugabe von sogenannten Enhancer-Stoffen (z.B. Forskolin) vermindert werden kann (Clesham et al. 1996; Bauer et al. 2005). Entsprechend ist bei den schwächeren nichtviralen Promotoren die Genexpression geringer.

Des Weiteren ist bei den Promotoren, die durch intrazelluläre Botenstoffe aktiviert werden (sog. Transaktivatoren wie z.B. Serumfaktor oder Hormone wie Östrogen), eine ausreichend hohe Konzentration des Aktivators erforderlich. Daher wurde im Rahmen der Promotorstudie von Egr-1 eine supraphysiologische Konzentration von Östrogen mit 100 nM verwendet, um eine ausreichende Induktion von Egr-1-luc und den schwächeren Deletionsmutanten zu erzielen und hierbei keine schwachen Östrogeneffekte zu übersehen.

Um in einem Zellsystem die Wirkung eines Proteins auf einen Promotor untersuchen zu können, wird häufig eine Überexpression des entsprechenden Proteins durchgeführt. Zur Untersuchung der Östrogenrezeptorwirkung auf den Egr-1-Promotor wurde daher eine gleichzeitige Transfektion von Egr-1-luc mit der Östrogenrezeptor-DNA durchgeführt (sog. Kotransfektion). Hier ist ebenfalls das Problem unterschiedlich starker Promotoren erkennbar: während die Expression der Östrogenrezeptoren durch ihren viralen Promotor hoch ist, ist die Expression von Egr-1-luc zum einen von der Östrogendosis abhängig und zum anderen per se deutlich schwächer als die Proteinexpression des viralen Promotors (RSV-ER $\alpha$  bzw. CMV-ER $\beta$ ).

Die Dosiswirkungsuntersuchung der Kotransfektion von Egr-1-luc mit dem Östrogenrezeptor ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  zeigte, dass bei einer Kotransfektion mit gleichen Mengen von Östrogenrezeptor-DNA und Egr-1-luc in den Herzmuskelzellen wesentlich mehr Östrogenrezeptor exprimiert wird als Egr-1-luc. Dies wurde auch durch den Vergleich eines viralen Promotors mit LacZ-Expression (CMV-LacZ) unter Kotransfektion einer gleichen Menge Egr-1-luc-DNA mit dem Ergebnis einer hohen LacZ-Expression bei gleichzeitig geringer Menge an Luciferaseenzym bewiesen (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde nach Dosiswirkungskorrelation eine deutlich geringere Menge der Östrogenrezeptor-DNA im Vergleich zur Plasmidmenge von Egr-1-luc transfiziert (1/50 der DNA-Menge des Reportergens Egr-1-luc). Hierbei konnte ein deutlicher Anstieg der östrogenabhängigen Induktion von Egr-1-luc nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.3-6 und 4.3-7).

## **5.2 Östrogenvermittelte Geninduktion in Kardiomyozyten**

In verschiedenen Studien konnte das Phänomen eines positiven Effekts von Östrogen auf das Herzkreislaufsystem mit einer Verringerung der kardiovaskulären Erkrankung bzw. Mortalität durch Myokardinfarkte beobachtet werden. Allerdings sind die genauen Mechanismen der protektiven Östrogenwirkung nur ansatzweise verstanden, weshalb sich bislang keine therapeutischen Konsequenzen ableiten ließen. Eine aktuelle Studie konnte bei Östrogensubstitution nach frischem

Myokardinfarkt bzw. instabiler Angina pectoris keine Verbesserung des Outcome nachweisen (Schulman et al. 2002).

Während bei der Untersuchung der protektiven Östrogenwirkung vorwiegend das kardiovaskuläre System im Vordergrund stand, ist im Gegensatz dazu der direkte Östrogeneffekt auf Herzmuskelzellen nur ansatzweise erforscht. Die Bedeutung der direkten Östrogenwirkung auf Kardiomyozyten lässt sich anhand der Tatsache belegen, dass eine pathologische Herzveränderung mit einer Veränderung der zellulären Östrogenrezeptorverteilung einhergeht (Mahmoodzadeh et al. 2006). In diesem Zusammenhang fand sich ein deutlicher Anstieg der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  im menschlichen Herzen bei erhöhter myokardialer Belastung im Rahmen von Aortenklappenstenosen (Nordmeyer et al. 2004). Insbesondere die auf zellulärer Ebene bestehende genregulierende Wirkung von Östrogen kann nach aktuellen Forschungsergebnissen über verschiedene zelluläre Signalkaskaden ablaufen, wobei schnelle (nichtgenomische) und langsame (genomische) Regulationsmechanismen zu finden sind (Marino et al. 2006).

Eine Genaktivierung in Herzmuskelzellen lässt sich durch Östrogen bereits in niedrigen Dosen, die deutlich unter dem physiologischen Hormonspiegel liegen, nachweisen: in der durchgeführten Promotorstudie mittels Egr-1-luc zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 100 pM eine signifikante Aktivitätssteigerung im Vergleich zum unstimulierten Promotor in isolierten neonatalen Kardiomyozyten (vgl. Abb. 4.3-3). Ebenfalls ließ sich unter physiologischer Östrogenkonzentration eine schnelle und starke Expression von Egr-1 auf Proteinebene nachweisen (Abb. 4.3-1).

Diese Ergebnisse zeigen, dass über den Botenstoff Östrogen in Herzmuskelzellen eine Genregulation innerhalb kurzer Zeit (15 min) in gleicher Weise stattfinden kann, wie dies bereits für Angiotensin II oder Endothelin nachgewiesen ist (Neyses et al. 1993).

Die Spezifität der Östrogenwirkung wurde durch die zusätzliche Gabe des spezifischen Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 nachgewiesen, worunter sämtliche Östrogeneffekte reversibel waren. Unter Verwendung hoher Dosierungen von ICI 182780 (1  $\mu$ M) ist von einer vollständigen Blockade beider Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) auszugehen, da eine unterschiedliche

Bindungskapazität von ICI 182780 nur in niedriger Dosis angegeben wird (Nicholson et al. 1995). Trotz der auch in niedriger Östrogenkonzentration nachweisbaren Geninduktion von Egr-1 erfolgten alle weiteren Promotoruntersuchungen in supraphysiologischer Konzentration von Östrogen mit 100 nM, um insbesondere bei den im Vergleich zum vollständigen Egr-1-Promotor wesentlich schwächeren Deletionsmutanten mögliche schwache Östrogeneffekte nicht zu übersehen.

Im Vergleich zur vernachlässigbar geringen Luciferaseaktivität des Leervektors pXp2-luc war eine Grundaktivität des Egr-1-Promotors auch bei nicht mit Östrogen inkubierten Kardiomyozyten detektierbar, die sich durch die Gabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 verringern ließ.

Es ist daher zu vermuten, dass eine minimale Aktivität der Östrogenrezeptoren auch ohne Östrogenzusatz bei neonatalen Kardiomyozyten vorliegt. Bereits 1993 wurde eine starke Bindungsfähigkeit des unbesetzten Östrogenrezeptors (also bei fehlendem Östrogenzusatz) an ERE-Sequenzen gezeigt (Furlow et al. 1993). Darauf weist auch eine Untersuchung von Mattick und Shapiro aus dem Jahr 1997 hin, die eine ERE-vermittelte Aktivität von Östrogenrezeptoren auch ohne Östrogenzugabe nachweisen konnten (Mattick et al. 1997).

Offensichtlich besteht eine minimale Grundaktivität von Östrogenrezeptoren, die mengenabhängig eine Geninduktion ohne Ligandenbindung hervorrufen kann (Mattick et al. 1997).

Diese These wird auch durch Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, die beim Egr-1-Promotor eine erhöhte Aktivität bei Kotransfektion der beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  ohne Östrogenzusatz belegen (vgl. 4.3-7).

Da die Östrogenstudien an neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt wurden, ist möglicherweise noch eine geringe Östrogenrestmenge in den neonatalen Kardiomyozyten von den Muttertieren erhalten geblieben, alternativ sind minimale Spuren von Östrogenkomponenten auch in östrogenfreien Medien zur Zellkulturzüchtung möglich.

Denkbar ist aber auch eine nicht östrogenvermittelte Aktivierung von Egr-1, wobei offenbar eine Beteiligung der Östrogenrezeptoren vorliegt, da sich die Aktivität mit Zugabe von Östrogenrezeptorantagonisten vermindert.

### **5.3 Unterschiedliche Effekte der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$ und ER $\beta$**

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Einklang mit anderen Forschungseinrichtungen beide Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  in Herzmuskelzellen nachweisen (Grohé et al. 1997).

Nachdem eine spezifische schnelle Wirkung von Östrogen auf den Egr-1-Promotor bereits bei niedriger Östrogenkonzentration detektiert werden konnte, stellte sich die Frage, welcher der beiden Östrogenrezeptoren für die östrogenvermittelte Geninduktion verantwortlich ist. Bereits Ende der 90iger Jahre wurde eine differenzierte zelltyp- und promotorabhängige Aktivität der beiden Östrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  konstatiert (Jones et al. 1999).

Da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Östrogenrezeptorantagonist mit spezifischer Bindung an einen der beiden Östrogenrezeptoren vorhanden war, sondern nur Antagonisten für beide Rezeptoren (ICI 182780), konnte mit diesen Rezeptorantagonisten aufgrund der fehlenden Unterscheidungsfähigkeit zwischen beiden Rezeptoren diese Fragestellung nicht beantwortet werden, vgl. die Bindungsstudie von ICI 182780 von Nicholson et al. (1995).

Es wurden daher Transfektionsexperimente mit Überexpression eines der beiden Rezeptoren mittels gleichzeitiger Transfektion von Östrogenrezeptor-DNA und Promotor-DNA durchgeführt (sog. Kotransfektion). Hierbei konnte jeweils durch die Überexpression einer der beiden Rezeptoren eine rezeptorabhängige Änderung der Östrogenwirkung analysiert werden.

Bei der Promotorinduktion von Egr-1 durch Östrogen zeigte sich wie erwartet durch Kotransfektion von ER $\alpha$  und ER $\beta$  jeweils eine ausgeprägte Steigerung der Östrogenwirkung, zwischen den beiden Rezeptoren konnte kein signifikanter Wirkungsunterschied festgestellt werden (vgl. Abb. 4.3-11).

Bei beiden Rezeptoren wurde die Östrogenwirkung mit dem Östrogenrezeptorantagonist ICI 182780 aufgehoben, so dass von einer spezifischen rezeptorgekoppelten Östrogenwirkung auf Herzmuskelzellen auszugehen ist. Die gleichen Ergebnisse fanden sich auch bei den Deletionsmutanten des Egr-1-Promotors, die serumresponsive Elemente (SRE) aufwiesen, ohne östrogenresponsive Elemente zu enthalten.

Möglicherweise sind die beiden Östrogenrezeptorsubtypen gemeinsam an der östrogenabhängigen Transaktivierung von Egr-1 in Herzmuskelzellen beteiligt, zumindest aber kann die Östrogenwirkung sowohl über ER $\alpha$  als auch über ER $\beta$  vermittelt werden.

Im Gegensatz dazu fand sich bei der Deletionsmutante des Egr-1-Promotors ohne serumresponsive Elemente (SRE), Konstrukt B, die stattdessen lediglich östrogenresponsive Elemente (ERE) beinhaltet, eine hochsignifikante Wirkdifferenz zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Während unter Östrogenstimulation die Kotransfektion des Östrogenrezeptor ER $\beta$  eine 6fache Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zum unstimulierten Promotor ergab, erreichte die Kotransfektion von ER $\alpha$  eine Steigerung um den Faktor 28 (vgl. Abb. 4.3-9). Das gleiche Phänomen einer stark ER $\alpha$ -abhängigen Geninduktion durch Östrogen konnte bei Kotransfektion der Östrogenrezeptoren zu ERE-luc, einem künstlichen Promotor mit lediglich östrogenresponsiven Elementen (ERE), gezeigt werden.

Die promotorinduzierende Wirkung von Östrogen über ERE wurde durch den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  vierfach stärker als durch den Östrogenrezeptor ER $\beta$  erhöht. Der Östrogeneffekt war unter gleichzeitiger Applikation des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 reversibel.

Dies deutet darauf hin, dass bei der „klassischen“ Geninduktion von Östrogen über östrogenresponsive Elemente (ERE) eines Promotors der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  an Herzmuskelzellen offenbar die wichtigere Rolle spielt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Östrogenrezeptor ER $\alpha$  im Vergleich zu ER $\beta$  an verschiedenen östrogenresponsiven Elementen (Cowley, Parker 1999; Yi et al. 2002; Mosselman et al. 1996; Hall, McDonnell 1999; Jones et al. 1999; Tyulmenkov, Klinge 2001; Klinge 2001). Interessanterweise scheint die erhöhte transkriptionelle Aktivität von ER $\alpha$  mit einer höheren Bindungsfähigkeit an östrogenresponsive Elemente zu korrelieren, wobei die transkriptionelle Aktivität des Östrogenrezeptors ER $\beta$  offenbar weniger von der Bindungsfähigkeit beeinflusst wird (Kulakosky et al. 2002).

Daneben induziert der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  eine deutlich stärkere Veränderung der tertiären DNA-Struktur (Bending) durch Bindung an ERE, als dies beim



Östrogenrezeptor ER $\beta$  der Fall ist (Schultz et al. 2002). Die Konformationsänderung der betroffenen DNA-Sequenz kann dadurch entweder eine Verstärkung oder Blockade von interagierenden Transkriptionsfaktoren bewirken (Klinge et al. 2001). Möglicherweise ist die erhöhte transkriptionelle Aktivität von ER $\alpha$  an östrogenresponsiven Elementen (ERE) auf die höhere DNA-Konformationsänderung und eine stärkere Rekrutierung von Kofaktoren wie z.B. TIF-2 (transcriptional intermediary factor-2) zurückzuführen (Yi et al. 2002).

In ähnlicher Weise erfolgt die östrogenabhängige NO-Produktion in murinen aortalen Muskelzellen ebenfalls über Vermittlung des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  und nicht über ER $\beta$  (Darblade et al. 2002). Weiterhin findet eine östrogenabhängige akute Aortendilatation durch eine alleinige Vermittlung des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  statt (Bolego et al. 2005). Offenbar ist auch eine östrogenabhängige Reduktion einer vaskulären Inflammation durch den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  vermittelt (Fadini et al. 2008). Darüber hinaus ist eine Interaktion zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  an Koronargefäßen gezeigt worden, wobei hier ER $\beta$  einen inhibierenden Effekt auf die ER $\alpha$ -vermittelte Vasodilatation der Koronarien aufwies (Traupe et al. 2007)

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten von McInerney, der bereits 1998 für die beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  eine gewebs- und promotorabhängige differenzierte Genaktivität zeigte (McInerney et al. 1998).

Nachgewiesen ist eine östrogenrezeptorvermittelte Genaktivierung über ERE durch Bindung von Homodimeren (ER $\alpha$ -ER $\alpha$  oder ER $\beta$ -ER $\beta$ ) aber auch von Heterodimeren (ER $\alpha$ -ER $\beta$ ) der beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Pace et al. 1997; Pettersson et al. 1997). Des Weiteren ist eine Interaktion von Östrogenrezeptoren mit sog. Klasse-II-Rezeptoren wie dem Thyreoidrezeptor bekannt, mit denen eine Aktivierung von ERE-halbsites unter Bildung von Heterodimeren möglich ist (Klinge et al. 1997).

Die Bindung von Östrogenrezeptordimeren findet üblicherweise an palindromische ERE-halbsites statt, es ist daneben aber auch eine Rezeptor-DNA-Bindung an eine einzelne ERE-halbsite möglich (Klein-Hitpass et al. 1989).

Neben der Anzahl der ERE-halbsites spielen insbesondere die Entfernung zur TATA-Box sowie die Distanz der halvesites untereinander eine Rolle in Bezug auf Aktivierung und Bindungsfähigkeit durch Östrogenrezeptoren (Sathya et al. 1997).

Daneben ist die eigentliche Gensequenz des östrogenresponsiven Elements zusammen mit flankierenden Sequenzen bei Abweichung vom Kerngerüst 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (minimales Grundgerüst eines östrogenresponsiven Elements), bestehend aus zwei ERE-halbsites, die mit drei freien Basenpaaren verbunden sind, vgl. (Klein-Hitpass et al. 1988), entscheidend (Driscoll et al. 1998). Andererseits scheinen auch anhängende AT-reiche Sequenzen in der 3'-Region eine Beeinflussung der Bindungsfähigkeit der Östrogenrezeptoren an ERE zu bewirken (Kulakosky et al. 2002).

Neuere Untersuchungen in Bezug auf Bindungsverhalten der Östrogenrezeptorsubtypen an östrogenresponsiven Elementen weisen darauf hin, dass als minimales ERE-Grundgerüst ein 15-Basenpaar-haltiges ERE-Palindrom anzusehen ist: 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3', da bei einem symmetrischen Austausch der letzten beiden Basenpaare (fett gedruckt) ein deutlicher Bindungsverlust der Östrogenrezeptoren resultiert (Kulakosky et al. 2002).

Die aus dem Kerngerüst unterschiedlich aufgebauten östrogenresponsiven Elemente bewirken im Rahmen der Rezeptor-DNA-Bindung eine Konformationsänderung der Zinkfingerdomäne der Rezeptoren (Fairall et al. 1993) und können somit genspezifisch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren modulieren und unterstützen eine differenzierte Genregulation (Wood et al. 1998; Nardulli et al. 1993; Hall et al. 2002; Yi et al. 2002; Geserick et al. 2005). Die im Rahmen der DNA-Protein-Interaktion stattfindende Konformationsänderung des Rezeptors wird als Ursache für die Bindungsfähigkeit von Östrogenrezeptoren an von der optimalen Bindungssequenz abweichende DNA-Elemente postuliert (Schwabe et al. 1995).

In gleicher Weise wird durch die Bindung des Rezeptors an die spezifische DNA-Sequenz eine Veränderung der tertiären Struktur der DNA induziert (DNA-Bending), was als Voraussetzung für eine effektive Genaktivierung bei gleichzeitiger Bindung von Transkriptionsfaktoren angesehen wird (Nardulli et al. 1995). Damit lassen sich auch unerwartet hohe Bindungsaffinitäten von inkompletten bzw. von der optimalen Bindungssequenz abweichende ERE-sites an den Östrogenrezeptor erklären (R. Schwabe et al. 1995).

In ähnlicher Weise wird eine Steigerung der Bindungsfähigkeit von Östrogenrezeptordimeren an inkomplette EREs durch eine vorangehende Bindung eines ER-Dimers an ein naheliegendes vollständiges ERE beschrieben, was ebenfalls auf eine Änderung der tertiären DNA-Struktur zurückzuführen ist (Martinez 1989).

Die ERE-vermittelte Genaktivierung wird durch eine Bindung von Östrogenrezeptoren, die eine Ligandenbindung durch Östrogen aufweisen, an die östrogenresponsiven Elemente (ERE) des jeweiligen Promotors bewirkt, so dass Östrogen mit dem Rezeptor als direkter Transkriptionsfaktor wirkt.

Dieser „klassische“ Induktionsweg ist allerdings bei der östrogeninduzierten Transaktivierung von Egr-1 in Kardiomyozyten für die Genregulation nicht von Bedeutung.

#### ***5.4 Mechanismus des schnellen, nichtgenomischen Effekts von Östrogen auf Egr-1***

Der Egr-1-Promotor besteht aus insgesamt 1200 Basenpaaren und enthält im Anfangsbereich (nt 171-175 und 196-200) zwei intakte ERE-halbsites (estrogen responsive elements) in unmittelbarer Nachbarschaft zu zwei AP-1-sites (Aktivatorprotein 1). Der klassische Mechanismus einer östrogenrezeptorabhängigen Geninduktion geschieht durch Bindung von Östrogenrezeptordimeren an zwei ERE-halbsites, die durch wenige dazwischen liegende Basenpaare getrennt sind (Klein-Hitpass et al. 1988).

Entgegen der primären Erwartung erfolgte die Aktivierung von Egr-1 durch Östrogen nicht über die östrogenresponsiven Elemente, wie anhand einer Deletionsmutante des Egr-1-Promotors, die lediglich den proximalen Promotoranteil mit den ERE- und den AP-1-sites enthielt (Konstrukt B, vgl. Grafik 4.3-4), gezeigt werden konnte: trotz maximaler Stimulation mit 100 nM Östrogen ließ sich lediglich eine Promotoraktivität von 4% des vollständigen Promotors erzielen.

Es konnte in weiteren Transfektionsexperimenten nachgewiesen werden, dass die östrogenrezeptorabhängige Genaktivierung von Egr-1 über serumresponsive Elemente (SRE) vermittelt wird, wobei hierbei die distalen drei SRE für die Genaktivierung entscheidend sind.

Die distalen serumresponsiven Elemente finden sich im Egr-1-Promotor im Bereich nt -671 bis -661 (SRE 6), nt -633 bis -623 (SRE 5) und nt -617 bis -607 (SRE 4) und beinhalten die typische Basenfolge CCTTATATGG bzw. CCATATAAGG der serumresponsiven Elemente (CArG-Box: CC(A/T)<sub>6</sub>GG). Zwei SRE finden sich im proximalen Anteil des Promotors auf Position nt -369 bis -359 und nt -347 bis -337 (SRE 2 bzw. SRE 1). SRE 6 und SRE 4 zeichnen sich durch eine intakte SRE-Sequenz aus, während SRE 1, 2 und 5 jeweils ein geändertes Basenpaar (Mismatch) aufweisen. Ein weiteres SRE findet sich im Anschluss an SRE 4 im Bereich nt 598-608, hier sind allerdings 2 Mismatches vorhanden (SRE 3).

Die Geninduktion durch 17 $\beta$ -Östradiol über die serumresponsiven Elemente ließ sich durch die im Vergleich zum vollständigen Egr-1-Promotor mit 80% sehr hohe Aktivität der Deletionsmutante (Konstrukt C), die keine ERE, aber sämtliche SRE enthält, belegen. Unsere Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus nachweisen, dass eine östrogenvermittelte Promotorinduktion allein durch serumresponsive Elemente möglich ist (Induktion eines künstlichen Promotors mit 5 SRE: pSRE-luc, vgl. de Jager et al. 2001). In einer Studie von Duan an MCF-7 Brustkrebszellen mit Untersuchung des c-fos-Promotors, der lediglich SRE besitzt, wurde ebenfalls eine östrogeninduzierte Genaktivierung über SRE (unter Vermittlung der MAPKinase) aufgezeigt (Duan et al. 2001).

Durch Untersuchung einer weiteren Deletionsmutante des Egr-1-Promotors (Konstrukt D), die lediglich die distalen SRE (SRE 6-3) ohne die proximalen SRE enthielt, wurde die Bedeutung der distalen SRE für die Induktion durch Östrogen herausgestellt: über die proximalen SRE konnte eine Promotoraktivität von 60% im Vergleich zum Promotor mit Vorhandensein aller SRE festgestellt werden.

Bei allen Deletionsmutanten war die Wirkungsverstärkung des Östrogeneffektes durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  oder ER $\beta$  in gleicher Weise zu beobachten. Unter Kotransfektion von ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  konnte bei den Deletionsmutanten C/D, die jeweils SRE enthalten, keine signifikante Änderung der Promotoraktivität im Vergleich zum vollständigen Egr-1-Promotor festgestellt werden,

wohingegen bei Konstrukt B mit lediglich ERE-/AP-1-sites eine deutliche Reduktion der Promotoraktivität auf 4% (ER $\beta$ ) bzw. 12% (ER $\alpha$ ) auffiel.

Damit stellten sich die distalen drei SRE des Egr-1-Promotors als hauptverantwortlich für die östrogenvermittelte und rezeptorabhängige Geninduktion von Egr-1 in Kardiomyozyten dar.

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkungsverstärkung durch Kotransfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  ließ sich nicht belegen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer Forschungsgruppe an Kardiomyozyten wies Duan die Induktion von Egr-1 über SRE durch Östrogen in Brustkrebszellen nach, so dass sich die Genaktivierung von Östrogen über serumresponsive Elemente (SRE) als ein allgemeiner Mechanismus darstellt, der in verschiedenen Zellsystemen zur Anwendung gelangt.

In gleicher Weise konnte die schnelle, nichtgenomische Aktivität von Östrogenrezeptoren durch Experimente mit mutierten Östrogenrezeptoren (fehlende transkriptionelle Aktivität durch Verlust der DNA-bindenden Domäne, DBD) an Fibroblasten gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe von Auricchio wies hierbei nach, dass unter Östrogengabe eine MAPK-Aktivierung auch durch Östrogenrezeptoren mit fehlender Transkriptionsfähigkeit stattfindet (Castoria et al. 1999).

Bei Transfektionsexperimenten von Östrogenrezeptoren konnten diese sowohl im Cytoplasma als auch membranständig und im Zellkern nachgewiesen werden (Zhang et al. 2008).

Die genaue Funktionalität der membranständigen Östrogenrezeptoren ist bisher nicht geklärt: ein vasodilatativer Effekt im kardiovaskulären System ist für den G-Proteingekoppelten membranständigen Östrogenrezeptor (GPER) kürzlich gezeigt worden (Haas et al. 2009).

Bei zunehmendem Nachweis der Beteiligung von membrangebundenen Östrogenrezeptoren an der Vermittlung der schnellen nichtgenomischen Östrogenwirkung ist eine steigende Bedeutung der (häufig membranär nachweisbaren) verkürzten, sog. gespligten Östrogenrezeptoren erkennbar. So sind beim Östrogenrezeptor ER $\alpha$  mehrere verkürzte Splicing-Varianten nachgewiesen,

die bei fehlender N-terminalem A/B-Domäne mit der darin enthaltenen Aktivierungsfunktion AF-1 keine transkriptionelle Aktivität an ERE entfalten können (Flouriot et al. 2000), aber an der Vermittlung der nichtgenomischen Östrogenwirkung beteiligt sind (Li et al. 2003; Russell et al. 2000).

Für die Vermittlung des schnellen nichtgenomischen Östrogeneffekts durch Membranrezeptoren wird eine Rezeptordimerisation in der Membran postuliert, analog der intranukleären Genaktivierung durch Homo- und Heterodimere an den östrogenresponsiven DNA-Elementen. Allerdings scheint bei den Membranrezeptoren eine Homodimerbildung die Voraussetzung für eine Aktivierung der zellulären Signalkaskade zu sein (Razandi et al. 2004).

Offenbar wird die direkte genomischen Östrogenwirkung über ERE durch die traditionellen ungespaltten Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  vermittelt, wohingegen die schnellen nichtgenomischen Regulationsmechanismen über zelluläre Signalkaskaden eher durch membrangebundene Östrogenrezeptorsubtypen erzielt werden (Razandi et al. 2004).

In der weiteren Untersuchung der östrogenabhängigen Aktivierung von Egr-1 über serumresponsive Elemente des Egr-1-Promotors (SRE) konnte mittels Gelshift-Assays gezeigt werden, dass unter kurzer Östrogeneinwirkung (15 min) in physiologischer Konzentration (10 nM) eine schnelle Besetzung der distalen drei SRE des Egr-1-Promotor mit Transkriptionsfaktoren stattfindet (vgl. Abb. 4.3-12).

Unter Verwendung des Antikörpers gegen Serumfaktor (anti-SRF) resultierte ein Supershift des DNA-Protein-Komplexes, so dass der Nachweis der Bindung von Serumfaktor (SRF, Synonym p67) oder ein Protein gleicher Antigenität an SRE geführt werden konnte (vgl. Abb. 4.3-13).

Damit ist die Bindung von Serumfaktor bzw. eines Proteins mit den gleichen antigenen Strukturen wie Serumfaktor an die serumresponsiven Elemente (SRE) des Egr-1-Promotors eine Voraussetzung für die östrogenvermittelte Geninduktion.

SRF ist ein ca. 67 kDa schweres Protein mit hoher genetischer Konservierung, das in seiner DNA-Bindungsdomäne (MADS-Box) hohe Homologien zu Proteinen aus einzelligen Lebewesen (Sommer et al. 1990) wie auch eukaryotischen Organismen

aufweist (Shore, Sharrocks 1995). Die MADS-Box kodiert die Bindungsfähigkeit an die serumresponsiven DNA-Elemente (SRE), die aus der die CArG-Box beinhaltenden typischen Nukleotidsequenz CC(A/T)<sub>6</sub>GG besteht. Daneben stellt sie die Kontaktfläche zu Partnerproteinen wie TCF zur Verfügung. Die durch die MADS-Box verursachte Konformationsänderung ist Voraussetzung für die DNA-Bindung der serumresponsiven Elemente (Sharrocks, Shore 1995).

Die Bindungssequenz für Serumfaktor beinhaltet die CArG-Box und findet sich in regulatorischen Promotorregionen einer Reihe früher Wachstumgene (Treisman 1985, Treisman 1986).

Klassischerweise bindet Serumfaktor über die DNA-Bindungsdomäne (Hill et al. 1994) als Proteindimer an das serumresponsive Element (SRE) zusammen mit einem weiteren Protein aus der Familie der ets-Proteine (Price et al. 1995; Whitmarsh et al. 1995), die funktionell als ternary complex factors (TCF) transkriptionelle Aktivität aufzeigen.

Zu dieser Gruppe gehören die Proteine elk-1 (Hipskind et al. 1991), SAP-1 (Dalton, Treisman 1994) und Net/SAP-2 (Lopez et al. 1994; Price et al. 1995), die für die Signalaufnahme des MAPK-Signalweges verantwortlich zeichnen. Daneben kann SRF durch die Interaktion mit herzmuskelspezifischen Multiproteinkomplexen (z.B. GATA-4, TEF-1, Nkx-2.5, Myokardin etc.) eine transkriptionelle Steuerung bewirken (Chen, Schwartz 1996; Gupta et al. 2001; Wang et al. 2001).

Der genaue Mechanismus der SRF-Aktivierung ist noch nicht bis ins letzte Detail geklärt: die Phosphorylierung von SRF moduliert die Bindungsfähigkeit an SRE (Marais et al. 1992; Rivera et al. 1993). Hierzu wird eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade (GTPase aus der Rho-Proteinfamilie) postuliert (Hill et al. 1995; Treisman et al. 1998). Daneben wird auch eine direkte Aktivierung durch Steroidhormonen über SRC-Proteine (steroid receptor coactivator-1) beschrieben (Kim et al. 1998).

In der weiteren Signalkaskade erfolgt über aktivierte MAP-Kinasen ERK1/2 eine Aktivierung der Serin-Threonin-Kinasen 1-3 (MAPKAP-Kinasen: MAPK activated protein) Rsk1-3, die wiederum eine Phosphorylierung von Serumfaktor bewirken (Chen et al. 1993; Ginty et al. 1994; Xing et al. 1996). Ebenso ist eine

Phosphorylierung von Serumfaktor durch die Kinase p90SRK (p90 ribosomal S6 kinase) im Rahmen der MAPK-Signalkaskade (nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren) bekannt (Rivera et al. 1993).

Neben der Interaktion mit TCF (Treisman 1994) erfolgt die Steuerung der SRF-Aktivität auch durch die Mengenregulierung der im Zellkern befindlichen SRF-Proteine (Camoretti-Mercado et al. 2000) sowie durch das Vorhandensein von Splicing-Varianten (Kemp, Metcalfe 2000). Zur Ausbildung eines funktionellen Transaktivationskomplexes scheint aber die Anwesenheit von TCF erforderlich zu sein.

Der Aktivierungsweg von TCF wird durch eine Phosphorylierung über die Kinasen ERK1/2 beschrieben (Yang et al. 1997; Price et al. 1996). TCF alleine ist nicht in der Lage, an serumresponsive DNA-Elemente eine stabile Bindung einzugehen, sondern ist auf die gleichzeitige DNA-Bindung von Serumfaktor angewiesen (Schröter et al. 1990; Shaw 1992).

Die von TCF erkennbare DNA-Sequenz besteht aus der Basenfolge CAGGA(T) und ermöglicht eine spezifische Bindungsfähigkeit (Shore et al. 1995). Die Interaktion von TCF mit Serumfaktor erfolgt über definierte Domänen, die als SRF-bindende Domänen bezeichnet werden (Shore, Sharrocks 1994).

Aktuelle Forschungsergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Aktivierung von TCF wie Elk-1 eine Bindungsfähigkeit von ERK1/2 an Elk-1 über definierte Bindungssequenzen (KIM: kinase interacting motif im Bereich der D-Domäne von TCF) voraussetzt. Gleichzeitig ist das Vorhandensein von SRF erforderlich, wodurch ein Proteinkomplex aus SRF / Elk-1 / ERK am serumresponsiven Element entsteht (Alexandropoulos et al. 1992).

Die Aktivierung von ERK1/2 durch Östrogen kann sowohl durch den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  als auch durch ER $\beta$  vermittelt werden.

Eine östrogeninduzierte ERK1/2-Aktivierung wurde bereits von Nuedling et al. 1999 in Kardiomyozyten nachgewiesen (Nuedling et al. 1999).

Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Forschungsgruppe mit Nachweis einer eindeutigen ERK1/2-Aktivierung in neonatalen Kardiomyozyten unter kurzzeitiger Östrogenapplikation. Durch eine Hemmung der MEK (mitogen activated ERK-Kinase) mittels PD 983580 konnte eine Aufhebung des Protein-DNA-



Komplexes an den SRE-Bindungsstellen erreicht werden (vgl. Abb. 4.3-14). In gleicher Weise wurde die SRE-vermittelte Aktivität des Egr-1-Promotors durch PD 984580 aufgehoben. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass eine Induktion von Egr-1 in unterschiedlichsten Zellsystemen durch ERK1/2 vermittelt wird (Chiu et al. 1999; Hodge et al. 1998; Zhang et al. 2001).

Unter Hemmung der p38-Signalkaskade durch SB 203580 zeigte sich keine Veränderung der östrogeninduzierten Egr-1-Aktivität. In gleicher Weise wurde eine Besetzung der SRE-Oligonukleotide mit Serumfaktor oder einem antigengleichen Protein durch den MEK-Inhibitor PD 984580 blockiert, während die Inhibition der p38-Kinase mit SB 203580 keinen Effekt auf die Protein-DNA-Komplexbildung am SRE zeigte (vgl. Abb. 4.3-14). Damit konnte die spezifische Beteiligung der ERK-Signalkaskade unter Ausschluss des p38-Signalweges bei der östrogengetriggerten und rezeptorgekoppelten Egr-1-Induktion über serumresponsive Elemente (SRE) nachgewiesen werden.

Möglicherweise ist die in der Signaltransduktion übergeordnete MEK-Kinase 3 (MEKK3) in die östrogenvermittelte Aktivierung von ERK1/2 unter Ausschluss von p38 involviert, da sie typischerweise nur ERK1/2 und JNK aktiviert.

Der genaue Mechanismus der MAPK-Aktivierung durch Östrogen ist bislang nur zum Teil aufgeklärt, mehrere Arbeitsgruppen konnten in Prostatazellen wie auch in MCF-7-Zellen eine Ternary-complex-Formation aus Östrogenrezeptor, Androgenrezeptor und Src-Protein als aktivierenden Proteinkomplex nachweisen (Migliaccio et al. 2002; Chieffi et al. 2003).

Eine Interaktion ligandengebundener Östrogenrezeptoren mit Wachstumsfaktoren unter Aktivierung von MAPKinasen konnte für Herzmuskelzellen von Karas et al. nachgewiesen werden (Karas et al. 1998). Alternativ ist auch eine direkte Interaktion membrangebundener Östrogenrezeptoren mit übergeordneten regulatorischen Kinasen (MEKK – MEK-Kinase) möglich.

Die genregulatorische Wirkung des Steroidhormons Östrogen erfolgt neben dem klassischen Induktionsweg über direkte Bindung an östrogenresponsive Elemente (ERE) auch über die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, indem komplexe zelluläre Signalkaskaden (ERK/MAPK, p38/MAPK, PI3K/AKT, PLC/PKC) moduliert

werden (Marino et al. 2006). Damit stellt sich ein weitaus komplizierteres Profil dieses Steroidhormons dar (Pedram et al. 2002) und beweist das Potential einer vielfältigen und fein differenzierten Genregulation.

### **5.5 Ausblick**

Zum aktuellen Zeitpunkt sind Transfektionssysteme zur breiten Anwendung in der klinischen Medizin noch nicht etabliert. Da durch eine Veränderung der Genexpression oder der Proteinbiosynthese eine Beeinflussung von Proteinaktivität bei transfizierten Zellen möglich ist, stellt die Technik der Transfektion aber einen wichtigen therapeutischen Ansatz in der Behandlung von Erkrankungen dar, die entweder zellulären Ursprungs sind oder zelluläre Veränderungen im Sinne einer fehlenden oder überschießenden Proteinexpression aufweisen.

Während *in vitro* und *in vivo* bereits verschiedene Transfektionsmodelle mit hoher Effizienz Zellproteine überexprimieren oder unterdrücken können, besteht bei der klinischen Anwendung am Menschen noch deutliche Zurückhaltung, da verschiedene Probleme der *in vivo*-Transfektion bislang nicht gelöst sind.

Zum einen stellt die Spezifität des Transfektionssystems eine große Schwierigkeit dar, da ausschließlich die erkrankte Zellspezies transfiziert werden soll, während gesunde und benachbarte Zellen eines Organs nicht beeinflusst werden dürfen (Huard et al. 1995).

Zum anderen ist eine Heilung eines Defektes jeweils nur für die Generation der transfizierten Zellen möglich, die nächste Zellgeneration weist dagegen erneut die krankhafte Zellveränderung auf. Des Weiteren liegen bislang keine ausreichenden Langzeituntersuchungen zu möglichen Risiken wie teratogene Effekte oder Infektionsgefahr bei viralen Transfektionssystemen vor. Ein bislang noch nicht gelöstes Problem stellt die hohe Undurchlässigkeit der Gefäßmembranen - bedingt durch die dichte Basalmembran der Endothelien - für Adenoviren dar (Huard et al. 1996), was bei der primär favorisierten Applikationsform (intravenöse Applikation von CAR-abhängigen Vektoren) zu einer schlechteren Effizienz führt (Huard et al. 1995; Fechner et al. 1999).

Für die Zukunft ist bei Verbesserung der Spezifität und der Effizienz durchaus eine therapeutische Option zur zielgerichteten Therapie von Zelldefekten bzw. zellulären Veränderungen bei Krankheitsprozessen zu erwarten (Koh et al. 1995; Li et al. 1998; Melo et al. 2004; Laflamme et al. 2007). Insbesondere der Ersatz bzw. eine Unterstützung von erkranktem Herzmuskelgewebe (Schwartz, Kornowski 2003) durch molekularbiologisch optimiertes Ersatzgewebe (sog. „tissue engineering“, z.B. zur Ausreifung angeregte Stammzellen mit verbesserter Angiogenese) stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie kardialer Erkrankungen dar (Caplice 2006; Sharma, Raghurir 2007; Yuan et al. 2007; Jawad et al. 2008; Yang et al. 2008).

Eine erhöhte Gewebsspezifität wurde durch die Entwicklung von adenoviralen Vektoren mit modifizierten Fiberproteinen ermöglicht, die eine zellspezifische zelluläre Bindung der Viren an CAR oder alpha(v)beta(3)- und alpha(v)beta(5)-Integrine bewirken (Kibbe et al. 2000; Cirielli et al. 2004). So lassen sich mit modifizierten Adenoviren durch eine zusätzliche virale Expression eines speziellen Oberflächenmoleküls die ansonsten transfektionsresistenten glatten Muskelzellen erfolgreich (> 75%) mit adenoviralen Vektoren transfizieren (Krom et al. 2005).

Ein vielversprechender Ansatz bei ischämischen Herzerkrankungen besteht in der Kombination von adenoviraler Transfektion zur Verbesserung der Angiogenese (Emanuelli, Madeddu 2001) mit der Zelltransplantation von gesunden Stammzellen, was *in vitro* eine deutliche Verbesserung der Angio- und Myogenese bewirkt (Gao et al. 2007). Des Weiteren ist eine Unterdrückung von pathologischen Zellveränderungen nach Ischämie durch Transfektion von kurzen RNA-Sequenzen (short RNA) zur gezielten Proteininhibition möglich (Hurtado et al. 2005). Ebenso lässt sich durch adenoviral kodierte Proteinantagonisten (TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ) im Mausmodell eine postischämische Myokardfibrose verhindern und eine verbesserte zelluläre Antwort auf einen stattgehabten Myokardinfarkt bewirken (Okada et al. 2005).

Umgekehrt kann durch eine adenovirale Transfektion ein nach Myokardinfarkt auftretender Proteinmangel eines Calcium-bindenden Proteins (S100A1) aufgehoben und dadurch eine Normalisierung der intrazellulären Elektrolyte und Kontraktilität wiederhergestellt werden (Most et al. 2004). Mit zunehmender Kenntnis über die für die Zellreifung verantwortlichen genetischen Konstellationen wird sich auch eine Kontrolle der Zellentwicklung durch Wachstums- und Differenzierungsgene etablieren

lassen, so dass eine gezielte Umwandlung von Stammzellen in differenzierte Kardiomyozyten möglich sein wird (Gallo et al. 2008).

Mittlerweile lässt sich auch die Transfektion mehrerer Gene gleichzeitig (multigene transfection) erfolgreich durchführen (Abunasra et al. 2003; Lee et al. 2005) und weckt damit ein besonderes klinisches Interesse, da eine pathologische Zellentwicklung selten nur ein einziges Genprodukt betrifft. Damit ist nun auch im experimentellen Bereich eine Korrelation von Zellveränderungen in Abhängigkeit der Transfektion *in vivo* möglich, da bei gleichzeitigem Einbringen eines spezifischen Reportergens und des eigentlichen Zielgens eine nichtinvasive Bildgebung der transfizierten Zellen möglich wird (Bengel et al. 2003).

Verschiedene, zumeist adenoviral gestützte Techniken zur *in vivo*-Transfektion am Herzen sind bereits entwickelt (Gojo et al. 1998; Davidson et al. 2001; Logeart et al. 2001; Ding et al. 2004).

Bei zunehmender technischer Verbesserung im Bereich der Nanotechnologie konnten schon einzelne Peptide rekombinant aus Influenzaviren konstruiert werden (Couvreux et al. 2002), die zu einer Membranlyse ohne das Kapsid führten, was der erste Schritt zu einem hocheffizienten nichtviralen und damit nichtimmunogenen Transfektionssystem ist (Plank et al. 1998; Fattal, Barratt 2009).

Langfristiges Ziel der Transfektionstechnik wird eine nanotechnologische Verbindung von DNA-Plasmiden mit ungefährlichen Virusbestandteilen, aber gleichzeitig virusartigen Eigenschaften (hohe Infektionspotenzial im Sinne einer hohen Transfektionsleistung) ohne die Gefahr einer Virusschädigung sein (van Gaal et al. 2006; Mastrobattista et al. 2006).

Die Steuerung der Genexpression einzelner pathologischer oder protektiver Gene stellt einen interessanten therapeutischen Ansatz dar (Maru et al. 2009).

In der Kombination einer gezielten Gentherapie (virale Transfektion) auf Basis der zugrunde liegenden Pathologie mit einer Substitution erkrankten Gewebes durch gesunde Zellen (molekularbiologisch optimierte Stammzellen) liegt ein hohes Potenzial für die klinische Anwendung (Roncalli et al. 2008; Ruvinov et al. 2008).

Eine unverändert hohe Bedeutung wird der Transfektion zur Studie von Gen- und Proteinwirkung auf zellulärer Ebene bei der Erforschung von Krankheiten und der Zellphysiologie (Lee et al. 1999) auch in Zukunft zukommen.

Die Erforschung zellulärer Signalmechanismen spielt eine entscheidende Rolle zum Verständnis der intrazellulären Abläufe und Steuerungsmechanismen und trägt damit zu einem besseren Wissen bei und stellt die Grundlage für mögliche Therapien von krankhaften Zellveränderungen dar. In der aktuellen Arbeit konnte ein neuartiger Weg der östrogenvermittelten Genaktivierung gezeigt werden, der die Bedeutung der komplexen zellulären Regulationsmechanismen dieses Steroidhormons unterstreicht. Der protektive Effekt von 17 $\beta$ -Östradiol auf das kardiovaskuläre System ist in verschiedenen Studien und an Tiermodellen nachgewiesen worden, aufgrund der Nebenwirkungen einer Östrogensubstitution gibt es bislang allerdings keine Indikation für eine therapeutische Östrogenanwendung bei Herzerkrankungen (Waters 2002).

Durch die zunehmenden Forschungsergebnisse der unterschiedlichen Wirkungen der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  wie auch durch die genauere Kenntnis der östrogenvermittelten Geninduktion ergeben sich mögliche neue therapeutische Ziele im Sinne einer gezielten Gen- oder Proteinregulation.

Interessanterweise scheinen verschiedene genetische Varianten des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  unterschiedliche protektive Wirkungen zu entfalten: so lässt sich bei Patienten mit Niereninsuffizienz im Endstadium bei Vorhandensein des CC-Genotyps des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  eine im Vergleich zu anderen Genotypen signifikante Mortalitätsreduktion bei ebenfalls verbesserten Lipidkonzentrationen und verminderten Entzündungsmarkern nachweisen (Kato et al. 2007).

Erste Entwicklungen von genetisch veränderten Östrogenrezeptoren lassen eine mögliche Beeinflussung der Genexpression durch synthetische Liganden ohne eine generalisierte Östrogenwirkung erwarten (Islam et al. 2009).

Mit der Entwicklung von selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM: selective estrogen receptor modulators), die eine gezielte Aktivierung oder Inhibition eines der beiden Östrogenrezeptoren ermöglichen (Osborne, Fuqua 2000), stellen sich neue Substanzen zur selektiven Beeinflussung der östrogenvermittelten Genregulation dar, die damit das Spektrum der Östrogensubstitution insbesondere im Hinblick auf kardiovaskuläre Risikoreduktion deutlich erweitern und als mögliches Ziel zur spezifischen Therapie kardialer Erkrankungen in Betracht kommen (Gustafsson

1998; Bolego et al. 2006; Harris 2006). So konnte beispielsweise für den selektiven Östrogenrezeptormodulator Raloxifen eine Inhibition kardialer Hypertrophie und Dysfunktion von Kardiomyozyten an Mäusen nachgewiesen werden (Ogita et al. 2004). Wie erste Untersuchungen der RUTH-Studie (Raloxifene Use for The Heart) zeigen, scheint Raloxifen zwar einen schwächeren Atheroskleroseschutz als Östrogen aufzuweisen, dafür aber ein deutlich niedrigeres Risiko für thrombembolische Ereignisse verglichen mit Östrogen (Cano et al. 2007).

Idealerweise sollte ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM: selective estrogen receptor modulator) die kardioprotektive Östrogenwirkung besitzen, also eine Unterstützung der koronaren Vasodilatation, antihypertrophe Wirkung in Herzmuskelzellen sowie Verbesserung der zellulären Antwort auf ischämische Ereignisse und Optimierung des Lipid- und Cholesterinspiegels zeigen (Bian et al. 2001). Gleichzeitig sollten SERM eine antiöstrogene Wirkung an den weiblichen Reproduktionsorganen entfalten und vor Osteoporose schützen, dabei aber kein erhöhtes Thromboserisiko aufweisen und weiterhin den positiven Östrogeneffekt auf das Gehirn ermöglichen (Anthony et al. 2001; Arun et al. 2002; Regitz-Zagrosek et al. 2007).

In Analogie zu den bereits in Entwicklung befindlichen gehirnspezifischen SERM – sog. Neuro-SERM (Zhao et al. 2005) – eröffnen sich mit selektiven Östrogenmodulatoren für die Zukunft für das kardiovaskuläre System wie auch für andere Organsysteme neue medikamentöse Therapiestrategien mit protektiver und präventiver Intention.

Möglicherweise wird sich mit der Weiterentwicklung von SERM wie auch durch weitere Untersuchungen von Phytoöstrogenen, die ein zu  $17\beta$ -Östradiol unterschiedliches Nebenwirkungsprofil aufweisen - Änderung der tertiären Konformation des Östrogenrezeptors nach Bindung von Phytoöstrogen (Routledge et al. 2000) - und östrogenrezeptorvermittelte Genregulation bewirken (Rickard et al. 2003; Naragoni et al. 2009), eine neuartige und nebenwirkungsarme östrogenbasierte Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen etablieren lassen (Cruz et al. 2008).

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst ein geeignetes System zur Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten zu etablieren, um anschließend die direkte Wirkung von Östrogen auf die Herzmuskelzelle zu untersuchen. Als Zielgen von Östrogen wurde das frühe Wachstumsgen Egr-1 (early growth response gene-1) ausgesucht, ein Transkriptionsfaktor aus der Zinkfingergruppe, da hierbei eine östrogenabhängige Geninduktion bereits nachgewiesen war.

Bei der Etablierung der Transfektion stellte sich lediglich im Gegensatz zu nichtviralen Transfektionsmethoden die viral unterstützte Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten mithilfe von Adenoviren im Rahmen des Poly-L-Lysin-Komponentensystems als effizient und zuverlässig heraus. Nach Systemoptimierung konnte mittels dieses Verfahrens die Östrogenwirkung am Egr-1-Promotor durch Transfektion des Luciferase-kodierenden Egr-1-Gens (Egr-1-luc) untersucht werden. Zunächst bestätigte sich die Induktion von Egr-1-luc durch Östrogen bereits unter minimalen Östrogenkonzentrationen auf Proteinebene wie auch in den folgenden Promotorstudien. Unter der in der weiteren Arbeit verwendeten Dosis von 100 nM Östrogen konnte eine sechsfache Induktion von Egr-1 durch Östrogen gezeigt werden, die durch Zugabe des Östrogenrezeptorantagonisten ICI reversibel war und damit die östrogenspezifische Induktion von Egr-1 belegte.

Durch die gleichzeitige Transfektion der Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  wurde die Östrogenwirkung auf Egr-1 jeweils zusätzlich verstärkt. Die Östrogenwirkung auf Egr-1 ist also rezeptorabhängig und wird in gleicher Weise durch die Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  vermittelt.

Durch Vergleich der Egr-1-Induktion mit Hilfe von Deletionsmutanten (Konstrukt B bis D) ließ sich der Nachweis führen, dass die Induktion des Egr-1-Promotors nicht über östrogenresponsive Elemente (ERE), sondern über serumresponsive Elemente (SRE) erfolgt. Dieser Effekt war bei Vermehrung der Östrogenrezeptormenge durch Kotransfektion von ER $\alpha$  und ER $\beta$  jeweils signifikant erhöht.

Interessanterweise fand sich bei der Untersuchung einer nachweisbaren schwachen Östrogenwirkung über östrogenresponsiven Elemente (ERE), dass durch den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  eine deutlich stärkere Induktion einer Deletionsmutante des Egr-1-Promotors mit lediglich ERE in Herzmuskelzellen zu verzeichnen ist als durch

den Östrogenrezeptor ER $\beta$ . Dies bestätigten auch Versuche mit einem künstlichen Promotor, der ausschließlich östrogenresponsive Elemente (ERE) enthielt (ERE-luc). Da eine östrogenabhängige Geninduktion über serumresponsive Elemente einen bis dato nicht nachgewiesener Induktionsweg darstellte, wurden weitergehende Untersuchungen der SRE-Bindungsstellen des Egr-1-Promotors mittels Gelshift-Assays durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass unter Östrogenwirkung analog zur Wirkung von fötalem Kälberserum die SRE-Bindungsstelle durch Serumfaktor bzw. ein Protein besetzt wird, das vom Antikörper gegen Serumfaktor (SRF) erfasst wird. Damit ließ sich die Hypothese einer nichtgenomischen schnellen Östrogenwirkung (innerhalb von 15 min), die Serumfaktor-vermittelt abläuft, belegen. Die Untersuchung mit Östrogenrezeptorantikörpern ergab keinen Nachweis einer Mitbeteiligung eines Östrogenrezeptors im DNA-/Proteinkomplex der SRE-Bindungsstelle. Die östrogeninduzierte Bindung von Serumfaktor an die SRE-Bindungsstellen ließen sich sowohl durch den Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182780 wie auch durch PD 98059 (MEK-Inhibition der ERK1/2) vollständig aufheben, eine Blockade der p38 MAP-Kinase durch SB 202190 zeigte keinen Effekt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Östrogen in physiologischer Konzentration in Kardiomyozyten eine schnelle Induktion des Egr-1-Promotors bewirkt, die östrogenrezeptorvermittelt abläuft. Überraschenderweise erfolgt die östrogenabhängige Genregulation von Egr-1 aber nicht über den klassischen Signalweg mittels Bindung des Östrogenrezeptors an östrogenresponsive Elemente (ERE), sondern findet unter Bindung von Serumfaktor an serumresponsive Elemente (SRE) des Egr-1-Promotors unter Mitbeteiligung des ERK1/2-Signalweges statt.

Am Beispiel der Egr-1-Induktion durch Östrogen ließ sich die Bedeutung serumresponsiver Elemente (SRE) für die Genregulation durch Östrogen aufzeigen. In der vorliegenden Arbeit konnte damit ein neuartiger Signalweg bei der östrogenabhängigen schnellen Genaktivierung in Kardiomyozyten gezeigt werden.



## 7 Literaturverzeichnis

- Abunasra, Haitham J .; Smolenski, Ryszard T.; Yap, John; Sheppard, Mary; O'Brien, Timothy; Yacoub, Magdi H (2003): Multigene adenoviral therapy for the attenuation of ischemia-reperfusion injury after preservation for cardiac transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125, 998-1006.
- Acconcia, Filippo; Ascenzi, Paolo; Bocedi, Alessio; Spisni, Enzo; Tomasi, Vittorio; Trentalance, Anna et al. (2005): Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol. Biol. Cell* 16, 231–237.
- Acsadi, Gyula; Jani, Agnes; Massie, Bernard; Simoneau, Maude; Holland, Paul; Blaschuk, Katharine; Karpati, George (1994): A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum. Mol. Genet.* 3, 579–584.
- Agabiti-Rosei, Enrico; Muiesan, Maria Lorenza (2002): Left ventricular hypertrophy and heart failure in women. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 20, S34-8.
- Alam, J.; Cook, J. L. (1990): Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188, 245–254.
- Alarid, E. T.; Bakopoulos, N.; Solodin, N. (1999): Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol. Endocrinol.* 13, 1522–1534.
- Alevizaki, M.; Saltiki, K.; Cimponeriu, A.; Kanakakis, I.; Xita, N.; Alevizaki, C. C. et al. (2007): Severity of cardiovascular disease in postmenopausal women: associations with common estrogen receptor {alpha} polymorphic variants. *Steroids* 156, 489–496.
- Alexander, M. Y.; Webster, K. A.; McDonald, P. H.; Prentice, H. M. (1999): Gene transfer and models of gene therapy for the myocardium. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 661–668.
- Alexandropoulos, K.; Qureshi, S. A.; Rim, M.; Sukhatme, V. P.; Foster, D. A. (1992): v-Fps-responsiveness in the Egr-1 promoter is mediated by serum response elements. *Nucleic Acids Res.* 20, 2355–2359.
- Anthony, M.; Williams, J. K.; Dunn, B. K. (2001): What would be the properties of an ideal SERM? *Annals of the New York Academy of Sciences* 949, 261–278.
- Antin, P. B.; Mar, J. H.; Ordahl, C. P. (1988): Single cell analysis of transfected gene expression in primary heart cultures containing multiple cell types. *BioTechniques* 6, 640-2, 645-9.
- Anversa, P.; Kajstura, J. (1998): Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ. Res.* 83, 1–14.
- Arun, B.; Anthony, M.; Dunn, B. (2002): The search for the ideal SERM. *Expert opinion on pharmacotherapy* 3, 681–691.
- Bai, M.; Campisi, L.; Freimuth, P. (1994): Vitronectin receptor antibodies inhibit infection of HeLa and A549 cells by adenovirus type 12 but not by adenovirus type 2. *J Virol* 68, 5925-5932.
- Baker, A.; Saltik, M.; Lehrmann, H.; Killisch, I.; Mautner, V.; Lamm, G. et al. (1997): Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Ther.* 4, 773–782.
- Barkhem, T.; Carlsson, B.; Nilsson, Y.; Enmark, E.; Gustafsson, J.; Nilsson, S. (1998): Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol. Pharmacol.* 54, 105–112.

- Barr, E.; Carroll, J.; Kalynych, A. M.; Tripathy, S. K.; Kozarsky, K.; Wilson, J. M.; Leiden, J. M. (1994): Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus. *Gene Ther.* 1, 51–58.
- Barrett-Connor, E. (1997): Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 95, 252–264.
- Bauer, Sebastian; Maier, Sebastian K. G.; Neyses, Ludwig; Maass, Alexander H. (2005): Optimization of gene transfer into neonatal rat cardiomyocytes and unmasking of cytomegalovirus promoter silencing. *DNA Cell Biol* 24, 381–387.
- Beato, M. (1989): Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335–344.
- Beato, M.; Chávez, S.; Truss, M. (1996a): Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61, 240–251.
- Beato, M.; Truss, M.; Chávez, S. (1996b): Control of transcription by steroid hormones. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 784, 93–123.
- Bengel, Frank M.; Anton, Martina; Richter, Thomas; Simoes, Marcus V.; Haubner, Roland; Henke, Julia et al. (2003): Noninvasive imaging of transgene expression by use of positron emission tomography in a pig model of myocardial gene transfer. *Circulation* 108, 2127–2133.
- Bergelson, J. M.; Cunningham, J. A.; Droguett, G.; Kurt-Jones, E. A.; Krithivas, A.; Hong, J. S. et al. (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320–1323.
- Bergelson, J. M.; Krithivas, A.; Celi, L.; Droguett, G.; Horwitz, M. S.; Wickham, T. et al. (1998): The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J. Virol.* 72, 415–419.
- Berry, M.; Metzger, D.; Chambon, P. (1990): Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9, 2811–2818.
- Berthois, Y.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. (1986): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2496–2500.
- Bett, A. J.; Prevec, L.; Graham, F. L. (1993): Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67, 5911–5921.
- Bian, Z.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. (2001): Selective estrogen receptor modulators and coronary heart disease. *Trends in cardiovascular medicine* 11, 196–202.
- Biermann, V.; Volpers, C.; Hussmann, S.; Stock, A.; Kewes, H.; Schiedner, G. et al. (2001): Targeting of high-capacity adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 12, 1757–1769.
- Björnström, Linda; Sjöberg, Maria (2002): Mutations in the estrogen receptor DNA-binding domain discriminate between the classical mechanism of action and cross-talk with Stat5b and activating protein 1 (AP-1). *J. Biol. Chem.* 277, 48479–48483.
- Bolego, Chiara; Cignarella, Andrea; Sanvito, Paola; Pelosi, Valeria; Pellegatta, Fabio; Puglisi, Lina; Pinna, Christian (2005): The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor- $\alpha$  agonists and is abolished by estrogen deprivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 1203–1208.
- Bolego, Chiara; Vegeto, Elisabetta; Pinna, Christian; Maggi, Adriana; Cignarella, Andrea (2006): Selective agonists of estrogen receptor isoforms: new perspectives for cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2192–2199.

- Boshart, M.; Weber, F.; Jahn, G.; Dorsch-Häsler, K.; Fleckenstein, B.; Schaffner, W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, 521–530.
- Brzozowski, A. M.; Pike, A. C.; Dauter, Z.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Engström, O. et al. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753–758.
- Camoretti-Mercado, B.; Liu, H. W.; Halayko, A. J.; Forsythe, S. M.; Kyle, J. W.; Li, B. et al. (2000): Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *J. Biol. Chem.* 275, 30387–30393.
- Cano, A.; Hermenegildo, C.; Oviedo, P.; Tarín, J. J. (2007): Selective estrogen receptor modulators and risk for coronary heart disease. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* 10, 97–111.
- Capecchi, M. R. (1980): High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479–488.
- Caplice, Noel M. (2006): The future of cell therapy for acute myocardial infarction. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 3 *Suppl* 1, S129-32.
- Castoria, G.; Barone, M. V.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Ametrano, D.; Migliaccio, A.; Auricchio, F. (1999): Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J.* 18, 2500–2510.
- Castro-Rivera, Emely; Samudio, Ismael; Safe, Stephen (2001): MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION - Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *The Journal of biological chemistry* 276, 30853–30861.
- Chambliss, K. L.; Yuhanna, I. S.; Mineo, C.; Liu, P.; German, Z.; Sherman, T. S. et al. (2000): Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ. Res.* 87, E44-52.
- Chambliss, Ken L.; Yuhanna, Ivan S.; Anderson, Richard G. W.; Mendelsohn, Michael E.; Shaul, Philip W. (2002): ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.* 16, 938–946.
- Chambraud, B.; Berry, M.; Redeuilh, G.; Chambon, P.; Baulieu, E. E. (1990): Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J. Biol. Chem.* 265, 20686–20691.
- Chen, C. Y.; Schwartz, R. J. (1996): Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac alpha-actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6372–6384.
- Chen, R. H.; Abate, C.; Blenis, J. (1993): Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10952–10956.
- Chieffi, Paolo; Kisslinger, Annamaria; Sinisi, Antonio A.; Abbondanza, Ciro; Tramontano, Donatella (2003): 17beta-estradiol-induced activation of ERK1/2 through endogenous androgen receptor-estradiol receptor alpha-*Src* complex in human prostate cells. *Int. J. Oncol.* 23, 797–801.
- Chillon, M.; Kremer, E. J. (2001): Trafficking and propagation of canine adenovirus vectors lacking a known integrin-interacting motif. *Hum Gene Ther* 12, 1815-1823.
- Chiu, J. J.; Wung, B. S.; Hsieh, H. J.; Lo, L. W.; Wang, D. L. (1999): Nitric oxide regulates shear stress-induced early growth response-1. Expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. *Circ. Res.* 85, 238–246.

- Christy, B. A.; Lau, L. F.; Nathans, D. (1988): A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 7857–7861.
- Cirielli, Corrado; Serino, Francesco; Straino, Stefania; Toietta, Gabriele; Abeni, Damiano; Ventrone, Giorgio et al. (2004): Adenovirus vectors targeting alphaV integrin or heparan sulfate receptors display different distribution of transgene activity after intramuscular injection. *J Gene Med* *6*, 309-316.
- Clesham, G. J.; Browne, H.; Efstathiou, S.; Weissberg, P. L. (1996): Enhancer stimulation unmasks latent gene transfer after adenovirus-mediated gene delivery into human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* *79*, 1188–1195.
- Cohen, C. J.; Shieh, J. T.; Pickles, R. J.; Okegawa, T.; Hsieh, J. T.; Bergelson, J. M. (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 15191–15196.
- Cotten, M.; Wagner, E.; Zatloukal, K.; Phillips, S.; Curiel, D. T.; Birnstiel, M. L. (1992): High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 6094–6098.
- Couvreux, Patrick; Barratt, Gillian; Fattal, Elias; Legrand, Philippe; Vauthier, Christine (2002): Nanocapsule technology: a review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* *19*, 99–134.
- Cowley, S. M.; Parker, M. G. (1999): A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *69*, 165–175.
- Cruz, Maria Natalia; Agewall, Stefan; Schenck-Gustafsson, Karin; Kublickiene, Karolina (2008): Acute dilatation to phytoestrogens and estrogen receptor subtypes expression in small arteries from women with coronary heart disease. *Atherosclerosis* *196*, 49–58.
- Curiel, D. T.; Agarwal, S.; Wagner, E.; Cotten, M. (1991): Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 8850–8854.
- Curiel, D. T.; Wagner, E.; Cotten, M.; Birnstiel, M. L.; Agarwal, S.; Li, C. M. et al. (1992): High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum. Gene Ther.* *3*, 147–154.
- Dahlberg, S. T. (1990): Gender difference in the risk factors for sudden cardiac death. *Cardiology* *77 Suppl 2*, 31–40.
- Dalton, S.; Treisman, R. (1994): Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* *76*, 411.
- Darblade, B.; Pendaries, C.; Krust, A.; Dupont, S.; Fouque, M-J; Rami, J. et al. (2002): Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor *90*, 413–419.
- Davidson, M. J.; Jones, J. M.; Emani, S. M.; Wilson, K. H.; Jagers, J.; Koch, W. J.; Milano, C. A. (2001): Cardiac gene delivery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* *104*, 131-133.
- Defer, C.; Belin, M. T.; Caillet-Boudin, M. L.; Boulanger, P. (1990): Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. *J. Virol.* *64*, 3661–3673.
- Ding, Z.; Fach, C.; Sasse, A.; Gödecke, A.; Schrader, J. (2004): A minimally invasive approach for efficient gene delivery to rodent hearts. *Gene Ther* *11*, 260-265.
- Donaldson, Cameron; Eder, Sarah; Baker, Corey; Aronovitz, Mark J.; Weiss, Alexandra Dabreo; Hall-Porter, Monica et al. (2009): Estrogen Attenuates Left Ventricular and

- Cardiomyocyte Hypertrophy by an Estrogen Receptor-Dependent Pathway That Increases Calcineurin Degradation. *Circulation Research Volume 104*, 265–275.
- Driscoll, M. D.; Sathya, G.; Muyan, M.; Klinge, C. M.; Hilf, R.; Bambara, R. A. (1998): Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J. Biol. Chem.* 273, 29321–29330.
- Duan, R.; Porter, W.; Safe, S. (1998): Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology* 139, 1981–1990.
- Duan, R.; Xie, W.; Burghardt, R. C.; Safe, S. (2001): Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J. Biol. Chem.* 276, 11590–11598.
- Dubey, R. K.; Imthurn, B.; Barton, M.; Jackson, E. K. (2005): Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovascular research* 66, 295–306.
- Dunn, F. G.; Pfeffer, M. A. (1999): Left ventricular hypertrophy in hypertension. *N. Engl. J. Med.* 340, 1279–1280.
- Emanuelli, C.; Madeddu, P. (2001): Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. *Br. J. Pharmacol.* 133, 951–958.
- Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G. et al. (1997): Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4258–4265.
- Evans, R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.
- Fadini, Gian Paolo; Kreutzenberg, Saula de; Albiero, Mattia; Coracina, Anna; Pagnin, Elisa; Baesso, Ilenia et al. (2008): Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 997–1004.
- Fairall, L.; Schwabe, J. W.; Chapman, L.; Finch, J. T.; Rhodes, D. (1993): The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* 366, 483–487.
- Fattal, Elias; Barratt, Gillian (2009): Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. *Br. J. Pharmacol.*
- Fechner, H.; Haack, A.; Wang, H.; Wang, X; Eizema, K.; Pauschinger, M. et al. (1999): Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther.* 6, 1520–1535.
- Fechner, Henry; Noutsias, Michel; Tschoepe, Carsten; Hinze, Kerstin; Wang, Xiaomin; Escher, Felicitas et al. (2003): Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism. *Circulation* 107, 876–882.
- Feldherr, C. M.; Akin, D. (1993): Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. *Exp. Cell Res.* 205, 179–186.
- Fisher, K. J.; Wilson, J. M. (1994): Biochemical and functional analysis of an adenovirus-based ligand complex for gene transfer. *Biochem. J.* 299 ( Pt 1), 49–58.
- Flouriot, G.; Brand, H.; Denger, S.; Metivier, R.; Kos, M.; Reid, G. et al. (2000): Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by

- distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* 19, 4688–4700.
- Fox, Caroline S.; Evans, Jane C.; Larson, Martin G.; Kannel, William B.; Levy, Daniel (2004): Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999: the Framingham Heart Study. *Circulation* 110, 522–527.
- Furberg, Curt D.; Vittinghoff, Eric; Davidson, Michael; Herrington, David M.; Simon, Joel A.; Wenger, Nanette K.; Hulley, Stephen (2002): Subgroup interactions in the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study: lessons learned. *Circulation* 105, 917–922.
- Furlow, J. D.; Murdoch, F. E.; Gorski, J. (1993): High affinity binding of the estrogen receptor to a DNA response element does not require homodimer formation or estrogen. *J. Biol. Chem.* 268, 12519–12525.
- Gallo, P.; Grimaldi, S.; Latronico, M. V. G.; Bonci, D.; Pagliuca, A.; Gallo, P. et al. (2008): A lentiviral vector with a short troponin-I promoter for tracking cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Gene Ther.* 15, 161–170.
- Gao, Feng; He, Tao; Wang, Hong Bing; Yu, Shi Quiang; Yi, Ding Hua; Liu, Wei Yong; Cai, Zhen Jie (2007): A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. *Can J Cardiol* 23, 891-898.
- García, Pedrero J. M.; Zuazua, P.; Martínez-Campa, C.; Lazo, P. S.; Ramos, S. (2003): The naturally occurring variant of estrogen receptor (ER) ERDeltaE7 suppresses estrogen-dependent transcriptional activation by both wild-type ERalpha and ERbeta. *Endocrinology* 144, 2967–2976.
- Gardin, J. M.; Siscovick, D.; Anton-Culver, H.; Lynch, J. C.; Smith, V. E.; Klopfenstein, H. S. et al. (1995): Sex, age, and disease affect echocardiographic left ventricular mass and systolic function in the free-living elderly. The Cardiovascular Health Study. *Circulation* 91, 1739–1748.
- Gaub, M. P.; Bellard, M.; Scheuer, I.; Chambon, P.; Sassone-Corsi, P. (1990): Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 63, 1267–1276.
- Geserick, C.; Meyer, H. A.; Haendler, B. (2005): The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. *Molecular and cellular endocrinology* 236, 1–7.
- Ghosh, Debadyuti; Barry, Michael A. (2005): Selection of Muscle-Binding Peptides from Context-Specific Peptide-Presenting Phage Libraries for Adenoviral Vector Targeting. *J. Virol.* 79, 13667-13672.
- Giguère, V.; Yang, N.; Segui, P.; Evans, R. M. (1988): Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331, 91–94.
- Ginty, D. D.; Bonni, A.; Greenberg, M. E. (1994): Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77, 713–725.
- Gluzman Y (1985): Eucaryotic viral vectors. Helper-free adenovirus type-5 vectors. Unter Mitarbeit von Reichl H. Solnick D. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gojo, S.; Niwaya, K.; Taniguchi, S.; Nishizaki, K.; Kitamura, S. (1998): Gene transfer into the donor heart during cold preservation for heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 65, 647-652.
- Göttlicher, M.; Heck, S.; Herrlich, P. (1998): Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* 76, 480–489.

- Gougelet, Angélique; Mueller, Stefan O.; Korach, Ken S.; Renoir, Jack-Michel (2007): Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER)beta-mediated transcriptional repression of ERalpha. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *104*, 110–122.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* *36*, 59–74.
- Green, S.; Chambon, P. (1988): Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* *4*, 309–314.
- Green, S.; Kumar, V.; Krust, A.; Walter, P.; Chambon, P. (1986a): Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *51 Pt 2*, 751–758.
- Green, S.; Walter, P.; Greene, G.; Krust, A.; Goffin, C.; Jensen, E. et al. (1986b): Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J. Steroid Biochem.* *24*, 77–83.
- Grohé, C.; Kahlert, S.; Löbber, K.; Stimpel, M.; Karas, R. H.; Vetter, H.; Neyses, L. (1997): Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* *416*, 107–112.
- Gronemeyer, H.; Laudet, V. (1995): Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein profile* *2*, 1173–1308.
- Gupta, M.; Kogut, P.; Davis, F. J.; Belaguli, N. S.; Schwartz, R. J.; Gupta, M. P. (2001): Physical interaction between the MADS box of serum response factor and the TEA/ATTS DNA-binding domain of transcription enhancer factor-1. *J. Biol. Chem.* *276*, 10413–10422.
- Gupta, M. P.; Gupta, M.; Zak, R.; Sukhatme, V. P. (1991): Egr-1, a serum-inducible zinc finger protein, regulates transcription of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. *J. Biol. Chem.* *266*, 12813–12816.
- Gustafsson, J. A. (1998): Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Current opinion in chemical biology* *2*, 508–511.
- Haas, Elvira; Bhattacharya, Indranil; Brailoiu, Eugen; Damjanovic, Marlen; Brailoiu, G. Cristina; Gao, Xin et al. (2009): Regulatory Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor for Vascular Function and Obesity. *Circ Res* *104*, 288–291.
- Hall, J. M.; McDonnell, D. P. (1999): The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* *140*, 5566–5578.
- Hall, J. M.; McDonnell, D. P.; Korach, K. S. (2002): Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* *16*, 469–486.
- Hall, Julie M.; McDonnell, Donald P. (2005): Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol. Interv.* *5*, 343–357.
- Harris, H. A. (2006): Preclinical characterization of selective estrogen receptor beta agonists: new insights into their therapeutic potential. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*, 149–161.
- He, Y.; Chipman, P. R.; Howitt, J.; Bator, C. M.; Whitt, M. A.; Baker, T. S. et al. (2001): Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat. Struct. Biol.* *8*, 874–878.
- Hill, C. S.; Wynne, J.; Treisman, R. (1994): Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. *EMBO J.* *13*, 5421–5432.
- Hill, C. S.; Wynne, J.; Treisman, R. (1995): The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* *81*, 1159–1170.

- Hipskind, R. A.; Rao, V. N.; Mueller, C. G.; Reddy, E. S.; Nordheim, A. (1991): Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* 354, 531–534.
- Ho, K. K.; Anderson, K. M.; Kannel, W. B.; Grossman, W.; Levy, D. (1993): Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88, 107–115.
- Hodge, C.; Liao, J.; Stofega, M.; Guan, K.; Carter-Su, C.; Schwartz, J. (1998): Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 273, 31327–31336.
- Hollenberg, S. M.; Weinberger, C.; Ong, E. S.; Cerelli, G.; Oro, A.; Lebo, R. et al. (1985): Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635–641.
- Huang, R. P.; Fan, Y.; Belle, I. de; Niemeyer, C.; Gottardis, M. M.; Mercola, D.; Adamson, E. D. (1997): Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int. J. Cancer* 72, 102–109.
- Huang, S.; Endo, R. I.; Nemerow, Glen R. (1995): Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J Virol* 69, 2257-2263.
- Huard, J.; Feero, W. G.; Watkins, S. C.; Hoffman, E. P.; Rosenblatt, D. J.; Glorioso, J. C. (1996): The basal lamina is a physical barrier to herpes simplex virus-mediated gene delivery to mature muscle fibers. *J. Virol.* 70, 8117–8123.
- Huard, J.; Lochmüller, H.; Acsadi, G.; Jani, A.; Massie, B.; Karpati, George (1995): The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther* 2, 107-115.
- Hulley, S.; Grady, D.; Bush, T.; Furberg, C.; Herrington, D.; Riggs, B.; Vittinghoff, E. (1998): Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 280, 605–613.
- Hurtado, Cecilia; Ander, Bradley P.; Maddaford, Thane G.; Lukas, Anton; Hryshko, Larry V.; Pierce, Grant N (2005): Adenovirally delivered shRNA strongly inhibits Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger expression but does not prevent contraction of neonatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 38, 647-654.
- Huss, Janice M.; Imahashi, Ken-ichi; Dufour, Catherine R.; Weinheimer, Carla J.; Courtois, Michael; Kovacs, Atilla et al. (2007): The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab.* 6, 25–37.
- Huss, Janice M.; Kelly, Daniel P. (2004): Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ. Res.* 95, 568–578.
- Islam, K. M.; Dilcher, M.; Thurow, C.; Vock, C.; Krimmelbein, I. K.; Tietze, L. F. et al. (2009): Directed evolution of estrogen receptor proteins with altered ligand-binding specificities. *Protein engineering, design & selection* : PEDS 22, 45–52.
- Jager, T. de; Pelzer, T.; Müller-Botz, S.; Imam, A.; Muck, J.; Neyses, L. (2001): Mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. Rapid gene activation via the ERK1/2 pathway and serum response elements. *J. Biol. Chem.* 276, 27873–27880.
- Jawad, Hedeer; Lyon, Alex R.; Harding, Sian E.; Ali, Nadire N.; Boccaccini, Aldo R. (2008): Myocardial tissue engineering. *Br. Med. Bull.* 87, 31–47.



- Jensen, E. V.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, W. E.; Jungblut, P. W.; DeSombre, E. R. (1968): A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 632–638.
- Jones, P. S.; Parrott, E.; White, I. N. (1999): Activation of transcription by estrogen receptor alpha and beta is cell type- and promoter-dependent. *J. Biol. Chem.* 274, 32008–32014.
- Kalin, M. F.; Zumoff, B. (1990): Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 55, 330–352.
- Kannel, W. B.; Wilson, P. W. (1995): Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch. Intern. Med.* 155, 57–61.
- Karas, R. H.; Gauer, E. A.; Bieber, H. E.; Baur, W. E.; Mendelsohn, M. E. (1998): Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J. Clin. Invest.* 101, 2851–2861.
- Kass-Eisler, A.; Falck-Pedersen, E.; Alvira, M.; Rivera, J.; Buttrick, P. M.; Wittenberg, B. A. et al. (1993): Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11498–11502.
- Kato, Sawako; Lindholm, Bengt; Axelsson, Jonas; Qureshi, Rashid A.; Barany, Peter; Heimbürger, Olof et al. (2007): Association between oestrogen receptor [alpha] gene polymorphism and mortality in female end-stage renal disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, 2571–2577.
- Kemp, P. R.; Metcalfe, J. C. (2000): Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *Biochem. J.* 345 Pt 3, 445–451.
- Kibbe, M. R.; A. Murdock, A.; Wickham, T.; Lizonova, A.; Kovesdi, I.; Nie, S. et al. (2000): Optimizing cardiovascular gene therapy: increased vascular gene transfer with modified adenoviral vectors. *Arch Surg* 135, 191–197.
- Kim, H. J.; Kim, J. H.; Lee, J. W. (1998): Steroid receptor coactivator-1 interacts with serum response factor and coactivates serum response element-mediated transactivations. *J. Biol. Chem.* 273, 28564–28567.
- Kim, H. P.; Lee, J. Y.; Jeong, J. K.; Bae, S. W.; Lee, H. K.; Jo, I. (1999): Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 257–262.
- Kim, Jin Kyung; Levin, Ellis R. (2006): Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nuclear receptor signaling* 4, e013.
- Kim, Jin Kyung; Pedram, Ali; Razandi, Mahnaz; Levin, Ellis R. (2006): Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *J. Biol. Chem.* 281, 6760–6767.
- Kinyamu, H. K.; Chen, J.; Archer, T. K. (2005): Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 281–297.
- Kirshenbaum, L. A.; MacLellan, W. R.; Mazur, W.; French, B. A.; Schneider, M. D. (1993): Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 92, 381–387.
- Klein-Hitpass, L.; Ryffel, G. U.; Heitlinger, E.; Cato, A. C. (1988): A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic acids research* 16, 647–663.
- Klein-Hitpass, L.; Tsai, S. Y.; Greene, G. L.; Clark, J. H.; Tsai, M. J.; O'Malley, B. W. (1989): Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Mol. Cell. Biol.* 9, 43–49.

- Klinge, C. M. (2001): Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2905–2919.
- Klinge, C. M. (2008): Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 105, 1342–1351.
- Klinge, C. M.; Bodenner, D. L.; Desai, D.; Niles, R. M.; Traish, A. M. (1997): Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Res.* 25, 1903–1912.
- Klinge, C. M.; Jernigan, S. C.; Smith, S. L.; Tyulmenkov, V. V.; Kulakosky, P. C. (2001): Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174, 151–166.
- Koh, G. Y.; Soonpaa, M. H.; Klug, M. G.; Field, L. J. (1995): Strategies for myocardial repair. *Journal of Interventional Cardiology* 8, 387–393.
- Kohout, T. A.; O'Brian, J. J.; Gaa, S. T.; Lederer, W. J.; Rogers, T. B. (1996): Novel adenovirus component system that transfects cultured cardiac cells with high efficiency. *Circ Res* 78, 971-977.
- Kovacs, Elizabeth J.; Plackett, Timothy P.; Witte, Pamela L. (2004): Estrogen replacement, aging, and cell-mediated immunity after injury. *J Leukoc Biol* 76, 36–41.
- Krasinski, K.; Spyridopoulos, I.; Asahara, T.; van der Zee, R.; Isner, J. M.; Losordo, D. W. (1997): Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95, 1768–1772.
- Krom, Y. D.; Gras, J. C. E.; Frants, R. R.; Havekes, L. M.; van Berkel, T. J.; E. A L Biessen, E. A. L.; van Dijk, K. Willems (2005): Efficient targeting of adenoviral vectors to integrin positive vascular cells utilizing a CAR-cyclic RGD linker protein. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 847-854.
- Krones-Herzig, Anja; Adamson, Eileen; Mercola, Dan (2003): Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3233–3238.
- Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5925–5930.
- Kulakosky, P. C.; McCarty, M. A.; Jernigan, S. C.; Risinger, K. E.; Klinge, C. M. (2002): Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 137–152.
- Kumar, V.; Chambon, P. (1988): The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55, 145–156.
- Kumar, V.; Green, S.; Stack, G.; Berry, M.; Jin, J. R.; Chambon, P. (1987): Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941–951.
- Kumar, V.; Green, S.; Staub, A.; Chambon, P. (1986): Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J.* 5, 2231–2236.
- Laflamme, Michael A.; Zbinden, Stephan; Epstein, Stephen E.; Murry, Charles E. (2007): Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. *Annual review of pathology* 2, 307–339.
- Laudet, V.; Hänni, C.; Coll, J.; Catzeflis, F.; Stéhelin, D. (1992): Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11, 1003–1013.

- Lawlor, Debbie A.; Timpson, Nick; Ebrahim, Shah; Day, Ian N. M.; Smith, George Davey (2006): The association of oestrogen receptor {alpha}-haplotypes with cardiovascular risk factors in the British Women's Heart and Health Study. *Eur Heart J* 27, 1597–1604.
- Lechardeur, Delphine; Lukacs, Gergely L. (2006): Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum. Gene Ther.* 17, 882–889.
- Lechardeur, Delphine; Verkman, A. S.; Lukacs, Gergely L. (2005): Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 755–767.
- Lee, Kyung-Han; Kim, Byung-Tae; Paik, Jin-Young; Matsui, Takashi; Choe, Yearn Seong; Choi, Yong; Kim, Byung-Tae (2005): Accuracy of myocardial sodium/iodide symporter gene expression imaging with radioiodide: evaluation with a dual-gene adenovirus vector. *J Nucl Med* 46, 652-657.
- Lee, L. Y.; Zhou, X.; D. R. Polce, D. R.; El-Sawy, T.; Patel, S. R.; Thakker, G. D. et al. (1999): Exogenous control of cardiac gene therapy: evidence of regulated myocardial transgene expression after adenovirus and adeno-associated virus transfer of expression cassettes containing corticosteroid response element promoters. *J Thorac Cardiovasc Surg* 118, 26-4, discussion 34-5.
- Lemaire, P.; Revelant, O.; Bravo, R.; Charnay, P. (1988): Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4691–4695.
- Leung, Yuet-Kin; Mak, Paul; Hassan, Sazzad; Ho, Shuk-Mei (2006): Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13162–13167.
- Li, C.; Briggs, M. R.; Ahlborn, T. E.; Kraemer, F. B.; Liu, J. (2001): Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology* 142, 1546–1553.
- Li, Lei; Haynes, M. Page; Bender, Jeffrey R. (2003): Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4807–4812.
- Li, R. K.; Yau, T. M.; Sakai, T.; Mickle, D. A.; Weisel, R. D. (1998): Cell therapy to repair broken hearts. *The Canadian journal of cardiology* 14, 735–744.
- Liu, C.; Rangnekar, V. M.; Adamson, E.; Mercola, D. (1998): Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer gene therapy* 5, 3–28.
- Liu, Meng-Min; Albanese, Chris; Anderson, Carol M.; Hilty, Kristin; Webb, Paul; Uht, Rosalie M. et al. (2002): Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 24353–24360.
- Lloyd-Jones, Donald; Adams, Robert; Carnethon, Mercedes; Simone, Giovanni de; Ferguson, T. Bruce; Flegal, Katherine et al. (2009): Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119, e21-181.
- Lobo, R. A. (2007): Surgical menopause and cardiovascular risks. *Menopause* 14, 562–566.
- Logeart, D.; Hatem, S. N.; Heimbürger, M.; Le Roux, A.; Michel, J. B.; J. J. Mercadier, J. J. (2001): How to optimize in vivo gene transfer to cardiac myocytes: mechanical or pharmacological procedures? *Hum Gene Ther* 12, 1601-1610.
- Lopez, M.; Oettgen, P.; Akbarali, Y.; Dendorfer, U.; Libermann, T. A. (1994): ERP, a new member of the ets transcription factor/oncoprotein family: cloning, characterization, and differential expression during B-lymphocyte development. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3292–3309.

- Lösel, Ralf; Wehling, Martin (2003): Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 46–56.
- Losordo, D. W.; Kearney, M.; Kim, E. A.; Jekanowski, J.; Isner, J. M. (1994): Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 89, 1501–1510.
- Lou, H.; Martin, M. B.; Stoica, A.; Ramwell, P. W.; Foegh, M. L. (1998): Upregulation of estrogen receptor-alpha expression in rabbit cardiac allograft. *Circ. Res.* 83, 947–951.
- Luisi, B. F.; Xu, W. X.; Otwinowski, Z.; Freedman, L. P.; Yamamoto, K. R.; Sigler, P. B. (1991): Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497–505.
- Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N.; Verkman, A. S. (2000): Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* 275, 1625–1629.
- Mader, S.; Chambon, P.; White, J. H. (1993): Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 21, 1125–1132.
- Mader, S.; Kumar, V.; Verneuil, H. de; Chambon, P. (1989): Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 338, 271–274.
- Mahmoodzadeh, Shokoufeh; Eder, Sarah; Nordmeyer, Johannes; Ehler, Elisabeth; Huber, Otmar; Martus, Peter et al. (2006): Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure 20, 926–934.
- Mahmoodzadeh, Shokoufeh; Pham, Hang; Davidson, Mercy M.; Regitz-Zagrosek, Vera (2008): Abstract 1477: Identification and Functional Analysis of Protein Interaction Partners of the Estrogen Receptor Alpha in the Human Heart. *Circulation* 118, S\_333-b.
- Majhen, Dragomira; Nemet, Josip; Richardson, Jennifer; Gabrilovac, Jelka; Hajsig, Martina; Osmak, Maja et al. (2009): Differential role of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in internalization and transduction efficacies of wild type and RGD4C fiber-modified adenoviruses. *Virus Res* 139, 64-73.
- Marais, R. M.; Hsuan, J. J.; McGuigan, C.; Wynne, J.; Treisman, R. (1992): Casein kinase II phosphorylation increases the rate of serum response factor-binding site exchange. *EMBO J.* 11, 97–105.
- Marcus, R.; Krause, L.; Weder, A. B.; Dominguez-Meja, A.; Schork, N. J.; Julius, S. (1994): Sex-specific determinants of increased left ventricular mass in the Tecumseh Blood Pressure Study. *Circulation* 90, 928–936.
- Marino, M.; Galluzzo, P.; Ascenzi, P. (2006): Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current genomics* 7, 497–508.
- Martinez, E. ; Wahli W. (1989): Cooperative binding of estrogen receptor to imperfect estrogen-responsive DNA elements correlates with their synergistic hormone-dependent enhancer activity. *EMBO-J.* 8, 3781–3791.
- Maru, B. S.; Tobias, J. H.; Rivers, C.; Caunt, C. J.; Norman; McArdle, C. A. (2009): Potential use of an estrogen-glucocorticoid receptor chimera as a drug screen for tissue selective estrogenic activity. *Bone* 44, 102–112.
- Mastrobattista, Enrico; van der Aa, Marieke A. E. M.; Hennink, Wim E.; Crommelin, Daan J. A. (2006): Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 115–121.
- Mathias, P.; Wickham, T.; Moore, M.; Nemerow, G. (1994): Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J. Virol.* 68, 6811–6814.

- Mattick, S.; Glenn, K.; Haan, G. de; Shapiro, D. J. (1997): Analysis of ligand dependence and hormone response element synergy in transcription by estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *60*, 285–294.
- McCaffrey, T. A.; Fu, C.; Du, B.; Eksinar, S.; Kent, K. C.; Bush, H. et al. (2000): High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* *105*, 653–662.
- McInerney, E. M.; Ince, B. A.; Shapiro, D. J.; Katzenellenbogen, B. S. (1996): A transcriptionally active estrogen receptor mutant is a novel type of dominant negative inhibitor of estrogen action. *Mol. Endocrinol.* *10*, 1519–1526.
- McInerney, E. M.; Katzenellenbogen, B. S. (1996): Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J. Biol. Chem.* *271*, 24172–24178.
- McInerney, E. M.; Weis, K. E.; Sun, J.; Mosselman, S.; Katzenellenbogen, B. S. (1998): Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology* *139*, 4513–4522.
- McMahon, S. B.; Monroe, J. G. (1995): A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of egr-1 through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1086–1093.
- Meidell, R. S.; Gerard, R. D.; Williams, R. S. (1992): The end of the beginning. Gene transfer into the vessel wall. *Circulation* *85*, 1219.
- Melo, Luis G.; Pachori, Alok S.; Kong, Deling; Gneccchi, Massimiliano; Wang, Kai; Pratt, Richard E.; Dzau, Victor J. (2004): Gene and cell-based therapies for heart disease. *FASEB J.* *18*, 648–663.
- Mendelsohn, Michael E.; Karas, Richard H. (1999): The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. *N Engl J Med* *340*, 1801–1811.
- Metzger, D.; Ali, S.; Bornert, J. M.; Chambon, P. (1995a): Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 9535–9542.
- Metzger, D.; Berry, M.; Ali, S.; Chambon, P. (1995b): Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.* *9*, 579–591.
- Michael, S. I.; Curiel, D. T. (1994): Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.* *1*, 223–232.
- Migliaccio, A.; Castoria, G.; Di Domenico, M.; Falco, A. de; Bilancio, A.; Auricchio, F. (2002): Src is an initial target of sex steroid hormone action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *963*, 185–190.
- Milbrandt, J. (1987): A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* *238*, 797–799.
- Miya, Yoshinori; Sumino, Hiroyuki; Ichikawa, Shuichi; Nakamura, Tetsuya; Kanda, Tsugiyasu; Kumakura, Hisao et al. (2002): Effects of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy and growth-promoting factors in hypertensive postmenopausal women. *Hypertens. Res.* *25*, 153–159.
- Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R. (1996): ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* *392*, 49–53.
- Most, Patrick; Pleger, Sven T.; Völkers, Mirko; Heidt, Beatrix; Boerries, Melanie; Weichenhan, Dieter et al. (2004): Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest* *114*, 1550–1563.

- Mück, A. O.; Seeger, H.; Korte, K.; Haasis, R.; Lippert, T. H. (1994 a): [Does estradiol modify the NO/cGMP system of blood vessels? Studies of the mechanism of cardiovascular protection by estrogen substitution in the postmenopausal period]. *Zentralbl Gynakol* 116, 507–511.
- Mück, A. O.; Seeger, H.; Korte, K.; Lippert, T. H. (1993): The effect of 17 beta-estradiol and endothelin 1 on prostacyclin and thromboxane production in human endothelial cell cultures. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 20, 203–206.
- Mück, A. O.; Seeger, H.; Korte, K.; Lippert, T. H. (1994 b): Cardiovascular protection by postmenopausal estrogen replacement therapy: possible mechanisms of the estrogen action. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 21, 143–149.
- Naragoni, S.; Sankella, S.; Harris, K.; Gray, W. G. (2009): Phytoestrogens regulate mRNA and protein levels of guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit (GNB1) in MCF-7 cells. *Journal of cellular physiology* 219, 584–594.
- Nardulli, A. M.; Greene, G. L.; Shapiro, D. J. (1993): Human estrogen receptor bound to an estrogen response element bends DNA. *Mol Endocrinol* 7, 331–340.
- Nardulli, A. M.; Grobner, C.; Cotter, D. (1995): Estrogen receptor-induced DNA bending. Orientation of the bend and replacement of an estrogen response element with an intrinsic DNA bending sequence. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 9, 1064–1076.
- Nathans, D. (1979): Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics. *Science* 206, 903–909.
- Neyses, L.; Nouskas, J.; Luyken, J.; Fronhoffs, S.; Oberdorf, S.; Pfeifer, U. et al. (1993): Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J. Hypertens.* 11, 927–934.
- Nguyen, V. T.; Morange, M.; Bensaude, O. (1988): Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal. Biochem.* 171, 404–408.
- Nicholson, R. I.; Gee, J. M.; Manning, D. L.; Wakeling, A. E.; Montano, M. M.; Katzenellenbogen, B. S. (1995): Responses to pure antiestrogens (ICI 164384, ICI 182780) in estrogen-sensitive and -resistant experimental and clinical breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 761, 148–163.
- Nilsson, S.; Mäkelä, S.; Treuter, E.; Tujague, M.; Thomsen, J.; Andersson, G. et al. (2001): Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81, 1535–1565.
- Nordmeyer, Johannes; Eder, Sarah; Mahmoodzadeh, Shokoufeh; Martus, Peter; Fielitz, Jens; Bass, Jan et al. (2004): Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis 110, 3270--3275.
- Noutsias, Michel; Fechner, Henry; Jonge, Henriette de; Wang, Xiaomin; Dekkers, Dick; Houtsmuller, A. B. et al. (2001): Human Coxsackie-Adenovirus Receptor Is Colocalized With Integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 on the Cardiomyocyte Sarcolemma and Upregulated in Dilated Cardiomyopathy: Implications for Cardiotoxic Viral Infections. *Circulation* 104, 275–280.
- Nuedling, S.; Kahlert, S.; Loebbert, K.; Meyer, R.; Vetter, H.; Grohé, C. (1999): Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 454, 271–276.
- Ogita, Hisakazu; Node, Koichi; Liao, Yulin; Ishikura, Fuminobu; Beppu, Shintaro; Asanuma, Hiroshi et al. (2004): Raloxifene prevents cardiac hypertrophy and dysfunction in pressure-overloaded mice 43, 237--242.

- Okada, Hideshi; Takemura, Genzou; Kosai, Ken-ichiro; Li, Yiwen; Takahashi, Tomoyuki; Esaki, Masayasu et al. (2005): Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation* 111, 2430-2437.
- O'Lone, Raegan; Frith, Martin C.; Karlsson, Elinor K.; Hansen, Ulla (2004): Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* 18, 1859–1875.
- Osborne, C. Kent; Fuqua, Suzanne A. W. (2000): Selective Estrogen Receptor Modulators: Structure, Function, and Clinical Use. *J Clin Oncol* 18, 3172–3186.
- Osborne, C. Kent; Schiff, Rachel (2005): Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol.* 23, 1616–1622.
- Pace, Paul; Taylor, Jacqueline; Suntharalingam, Sumathy; Coombes, R. Charles; Ali, Simak (1997): Human Estrogen Receptor beta Binds DNA in a Manner Similar to and Dimerizes with Estrogen Receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 272, 25832–25838.
- Paech, K.; Webb, P.; Kuiper, G. G.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.; Kushner, P. J.; Scanlan, T. S. (1997): Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277, 1508–1510.
- Pappas, T. C.; Gametchu, B.; Watson, C. S. (1995): Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* 9, 404–410.
- Parker, M. G. (1998): Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochem. Soc. Symp.* 63, 45–50.
- Patten, Richard D.; Pourati, Isaac; Aronovitz, Mark J.; Baur, Jason; Celestin, Flore; Chen, Xin et al. (2004): 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling 95, 692--699.
- Pedram, Ali; Razandi, Mahnaz; Aitkenhead, Mark; Hughes, Christopher C. W.; Levin, Ellis R. (2002): Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J. Biol. Chem.* 277, 50768–50775.
- Pedram, Ali; Razandi, Mahnaz; Sainson, Richard C. A.; Kim, Jin K.; Hughes, Christopher C.; Levin, Ellis R. (2007): A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 282, 22278–22288.
- Pelzer, T.; Schumann, M.; Neumann, M.; deJager, T.; Stimpel, M.; Serfling, E.; Neyses, L. (2000): 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 192–200.
- Pettersson, K.; Grandien, K.; Kuiper, G. G.; Gustafsson, J. A. (1997): Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* 11, 1486–1496.
- Pfeffer, R. I.; Kurosaki, T. T.; Charlton, S. K. (1979): Estrogen use and blood pressure in later life. *Am. J. Epidemiol.* 110, 469–478.
- Pietras, R. J.; Szego, C. M. (1977): Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265, 69–72.
- Plank; Zauner; Wagner (1998): Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34, 21–35.
- Poller, W.; Fechner, H.; Noutsias, M.; Tschoepe, C.; Pauschinger, M.; Schultheiss, H. -P (2002): The molecular basis of cardiotropic viral infections. *Eur Heart J Suppl* 4, I18-30.
- Price, M. A.; Hill, C.; Treisman, R. (1996): Integration of growth factor signals at the c-fos serum response element. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 351, 551–559.

- Price, M. A.; Rogers, A. E.; Treisman, R. (1995): Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *EMBO J.* 14, 2589–2601.
- Raines, E. W.; Ross, R. (1993): Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *British heart journal* 69, S30-7.
- Rastinejad, F.; Perlmann, T.; Evans, R. M.; Sigler, P. B. (1995): Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375, 203–211.
- Razandi, M.; Pedram, A.; Greene, G. L.; Levin, E. R. (1999): Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.* 13, 307–319.
- Razandi, M.; Pedram, A.; Levin, E. R. (2000): Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol. Endocrinol.* 14, 1434–1447.
- Razandi, Mahnaz; Alton, Gordon; Pedram, Ali; Ghonshani, Sanjiv; Webb, Paul; Levin, Ellis R. (2003): Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1633–1646.
- Razandi, Mahnaz; Pedram, Ali; Merchenthaler, Istvan; Greene, Geoffrey L.; Levin, Ellis R. (2004): Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol. Endocrinol.* 18, 2854–2865.
- Regitz-Zagrosek, V.; Wintermantel, T. M.; Schubert, C. (2007): Estrogens and SERMs in coronary heart disease. *Current opinion in pharmacology* 7, 130–139.
- Rickard, D. J.; Monroe, D. G.; Ruesink, T. J.; Khosla, S.; Riggs, B. L.; Spelsberg, T. C. (2003): Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *Journal of cellular biochemistry* 89, 633–646.
- Rivera, V. M.; Miranti, C. K.; Misra, R. P.; Ginty, D. D.; Chen, R. H.; Blenis, J.; Greenberg, M. E. (1993): A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6260–6273.
- Roncagli, Jerome; Tongers, Jörn; Renault, Marie-Ange; Losordo, Douglas W. (2008): Biological approaches to ischemic tissue repair: gene- and cell-based strategies. *Expert review of cardiovascular therapy* 6, 653–668.
- Rosamond, Wayne; Flegal, Katherine; Furie, Karen; Go, Alan; Greenlund, Kurt; Haase, Nancy et al. (2008): Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117, e25-146.
- Ross, R. S.; Pham, C.; Shai, S. Y.; Goldhaber, J. I.; Fenczik, C.; Glembotski, C. C. et al. (1998): Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 82, 1160-1172.
- Routledge, E. J.; White, R.; Parker, M. G.; Sumpter, J. P. (2000): Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.* 275, 35986–35993.
- Russell, K. S.; Haynes, M. P.; Sinha, D.; Clerisme, E.; Bender, J. R. (2000): Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5930–5935.
- Ruvinov, Emil; Dvir, Tal; Leor, Jonathan; Cohen, Smadar (2008): Myocardial repair: from salvage to tissue reconstruction. *Expert review of cardiovascular therapy* 6, 669–686.
- Saadane, N.; Alpert, L.; Chalifour, L. E. (1999): Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1165–1176.



- Saadane, N.; Alpert, L.; Chalifour, L. E. (2000): Altered molecular response to adrenoreceptor-induced cardiac hypertrophy in Egr-1-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H796-805.
- Sabbah, M.; Courilleau, D.; Mester, J.; Redeuilh, G. (1999): Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11217–11222.
- Safe, S. (2001): Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam. Horm.* 62, 231–252.
- Sathya, G.; Li, W.; Klinge, C. M.; Anolik, J. H.; Hilf, R.; Bambara, R. A. (1997): Effects of multiple estrogen responsive elements, their spacing, and location on estrogen response of reporter genes. *Mol. Endocrinol.* 11, 1994–2003.
- Satoh, Minoru; Matter, Christian M.; Ogita, Hisakazu; Takeshita, Kyosuke; Wang, Chao-Yung; Dorn, Gerald W.; Liao, James K. (2007): Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1 and prevention of congestive heart failure by estrogen. *Circulation* 115, 3197–3204.
- Schneider, M. D.; French, B. A. (1993): The advent of adenovirus. Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 88, 1937–1942.
- Schröter, H.; Mueller, C. G.; Meese, K.; Nordheim, A. (1990): Synergism in ternary complex formation between the dimeric glycoprotein p67SRF, polypeptide p62TCF and the c-fos serum response element. *EMBO J.* 9, 1123–1130.
- Schulman, Steven P.; Thiemann, David R.; Ouyang, Pamela; Chandra, Nisha C.; Schulman, Douglas S.; Reis, Steven E. et al. (2002): Effects of acute hormone therapy on recurrent ischemia in postmenopausal women with unstable angina. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 231–237.
- Schultz, J. R.; Loven, M. A.; Melvin, V. M.; Edwards, D. P.; Nardulli (2002): Differential modulation of DNA conformation by estrogen receptors alpha and beta. *The Journal of biological chemistry* 277, 8702–8707.
- Schwabe, J. W.; Chapman, L.; Finch, J. T.; Rhodes, D. (1993): The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75, 567–578.
- Schwabe, J. W.; Chapman, L.; Rhodes, D. (1995): The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation. *Structure* 3, 201–213.
- Schwabe, John W. R.; Chapman, Lynda; Rhodes, Daniela (1995): ScienceDirect - Structure : The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation. *Structure* 3.
- Schwartz, Yitzhack; Kornowski, Ran (2003): Autologous stem cells for functional myocardial repair. *Heart failure reviews* 8, 237–245.
- Sharma, Rishi; Raghubir, Ram (2007): Stem cell therapy: a hope for dying hearts. *Stem Cells Dev.* 16, 517–536.
- Sharrocks, A. D.; Shore, P. (1995): DNA bending in the ternary nucleoprotein complex at the c-fos promoter. *Nucleic Acids Res.* 23, 2442–2449.
- Shaul, P. W.; Anderson, R. G. (1998): Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.* 275, L843-51.
- Shaw, P. E. (1992): Ternary complex formation over the c-fos serum response element: p62TCF exhibits dual component specificity with contacts to DNA and an extended structure in the DNA-binding domain of p67SRF. *EMBO J.* 11, 3011–3019.

- Shearman, Amanda M.; Cooper, Jackie A.; Kotwinski, Paul J.; Miller, George J.; Humphries, Steve E.; Ardlie, Kristin G. et al. (2006): Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. *Circ. Res.* 98, 590–592.
- Shigekawa, K.; Dower, W. J. (1988): Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6, 742–751.
- Shore, P.; Bisset, L.; Lakey, J.; Waltho, J. P.; Virden, R.; Sharrocks, A. D. (1995): Characterization of the Elk-1 ETS DNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* 270, 5805–5811.
- Shore, P.; Sharrocks, A. D. (1994): The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3283–3291.
- Shore, P.; Sharrocks, A. D. (1995): The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229, 1–13.
- Simoncini, Tommaso; Rabkin, Elena; Liao, James K. (2003): Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 198–203.
- Simpson, P.; Savion, S. (1982): Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ. Res.* 50, 101–116.
- Smith, S. C.; Blair, S. N.; Bonow, R. O.; Brass, L. M.; Cerqueira, M. D.; Dracup, K. et al. (2001): AHA/ACC Guidelines for Preventing Heart Attack and Death in Patients With Atherosclerotic Cardiovascular Disease: 2001 update. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 1581–1583.
- Sommer, H.; Beltrán, J. P.; Huijser, P.; Pape, H.; Lönnig, W. E.; Saedler, H.; Schwarz-Sommer, Z. (1990): Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9, 605–613.
- Stanić, Vesna; Arntz, Yuri; Richard, Doriane; Affolter, Christine; Nguyen, Isabelle; Crucifix, Corinne et al. (2008): Filamentous condensation of DNA induced by pegylated poly-L-lysine and transfection efficiency. *Biomacromolecules* 9, 2048–2055.
- Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L. (1994): New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* 356, 361–366.
- Stratford-Perricaudet, L. D.; Makeh, I.; Perricaudet, M.; Briand, P. (1992): Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J. Clin. Invest.* 90, 626–630.
- Sukhatme, V. P.; Kartha, S.; Toback, F. G.; Taub, R.; Hoover, R. G.; Tsai-Morris, C. H. (1987): A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* 1, 343–355.
- Suzuki, A.; Mizuno, K.; Ino, Y.; Okada, M.; Kikkawa, F.; Mizutani, S.; Tomoda, Y. (1996): Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. *Cardiovasc. Res.* 32, 516–523.
- Takayama, K.; Ueno, H.; Pei, X. H.; Nakanishi, Y.; Yatsunami, J.; Hara, N. (1998): The levels of integrin alpha v beta 5 may predict the susceptibility to adenovirus-mediated gene transfer in human lung cancer cells. *Gene Ther* 5, 361–368.

- Tomko, R. P.; Xu, R.; Philipson, L. (1997): HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 3352–3356.
- Toran-Allerand, C. Dominique; Guan, Xiaoping; MacLusky, Neil J.; Horvath, Tamas L.; Diano, Sabrina; Singh, Meharvan et al. (2002): ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.* *22*, 8391–8401.
- Traupe, Tobias; Stettler, Christoph D.; Li, Huige; Haas, Elvira; Bhattacharya, Indranil; Minotti, Roberta; Barton, Matthias (2007): Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries. *Hypertension* *49*, 1364–1370.
- Treisman, R. (1985): Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell* *42*, 889–902.
- Treisman, R. (1986): Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* *46*, 567–574.
- Treisman, R. (1994): Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *4*, 96–101.
- Treisman, R.; Alberts, A. S.; Sahai, E. (1998): Regulation of SRF activity by Rho family GTPases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *63*, 643–651.
- Tremblay, G. B.; Tremblay, A.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Labrie, F.; Giguère, V. (1997): Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.* *11*, 353–365.
- Truss, Mathias; Beato, Miguel (1993): Steroid Hormone Receptors: Interaction with Deoxyribonucleic Acid and Transcription Factors. *Endocr Rev* *14*, 459–479.
- Tsai, M. J.; O'Malley, B. W. (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 451–486.
- Tsai-Morris, C. H.; Cao, X. M.; Sukhatme, V. P. (1988): 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res.* *16*, 8835–8846.
- Tyulmenkov, V. V.; Klinge, C. M. (2001): A mathematical approach to predict the affinity of estrogen receptors alpha and beta binding to DNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* *182*, 109–119.
- Umayahara, Yutaka; Kawamori, Ryuzo; Watada, Hirotaka; Imano, Eiichi; Iwama, Norimichi; Morishima, Toyohiko et al. (1994): Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *The Journal of biological chemistry* *269*, 16433–16442.
- van der Aa, Marieke A. E. M.; Mastrobattista, Enrico; Oosting, Ronald S.; Hennink, Wim E.; Koning, Gerben A.; Crommelin, Daan J. A. (2006): The nuclear pore complex: the gateway to successful nonviral gene delivery. *Pharm. Res.* *23*, 447–459.
- van Gaal, Ethlenn V. B.; Hennink, Wim E.; Crommelin, Daan J. A.; Mastrobattista, Enrico (2006): Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for nonviral gene therapy. *Pharm. Res.* *23*, 1053–1074.
- Vargas, R.; Wroblewska, B.; Rego, A.; Hatch, J.; Ramwell, P. W. (1993): Oestradiol inhibits smooth muscle cell proliferation of pig coronary artery. *Br. J. Pharmacol.* *109*, 612–617.
- Vijayanathan, Veena; Thomas, Thresia; Thomas, T. J. (2002): DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. *Biochemistry* *41*, 14085–14094.

- Wagner, E.; Cotten, M.; Foisner, R.; Birnstiel, M. L. (1991): Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4255–4259.
- Wagner, E.; Zenke, M.; Cotten, M.; Beug, H.; Birnstiel, M. L. (1990): Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3410–3414.
- Walter, P.; Green, S.; Greene, G.; Krust, A.; Bornert, J. M.; Jeltsch, J. M. et al. (1985): Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7889–7893.
- Wang, D.; Chang, P. S.; Wang, Z.; Sutherland, L.; Richardson, J. A.; Small, E. et al. (2001): Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851–862.
- Waters, David D. (2002): Estrogen therapy for unstable angina: another bump for the bandwagon. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 238–240.
- Watson, J. D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M. (1993): *Rekombinierte DNA*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Webb, P.; Lopez, G. N.; Uht, R. M.; Kushner, P. J. (1995): Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* 9, 443–456.
- Wet, J. R. de; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinski, D. R.; Subramani, S. (1987): Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 725–737.
- Whitmarsh, A. J.; Shore, P.; Sharrocks, A. D.; Davis, R. J. (1995): Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269, 403–407.
- Wickham, T. J.; Filardo, E. J.; Cheresh, D. A.; G. R. Nemerow, G. R. (1994): Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol* 127, 257-264.
- Wijayarathne, A. L.; McDonnell, D. P. (2001): The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J. Biol. Chem.* 276, 35684–35692.
- Witt, Henning; Schubert, Carola; Jaekel, Juliane; Fliegner, Daniela; Penkalla, Adam; Tiemann, Klaus et al. (2008): Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice 86, 1013--1024.
- Wood, J. R.; Greene, G. L.; Nardulli, A. M. (1998): Estrogen response elements function as allosteric modulators of estrogen receptor conformation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1927–1934.
- Xing, J.; Ginty, D. D.; Greenberg, M. E. (1996): Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959–963.
- Yamashita, S. (1998): Localization and functions of steroid hormone receptors. *Histol. Histopathol.* 13, 255–270.
- Yang, Chia-Feng; Chou, Kuang-Yi; Weng, Zen-Chung; Hung, Shih-Chieh; Lai, Shiau-Ting; Hsu, Chiao-Po; Wang, Jih-Shiuan (2008): Cardiac myocyte progenitors from adult hearts for myocardial regenerative therapy. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 71, 79–85.
- Yang, S.; Yates, P. R.; Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J.; Sharrocks, A. D. (1997): The regulation of TCF transcription factors by MAP kinase cascades. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 153S.
- Yang, Zhaoqing; Gagarin, Dmitry; St Laurent, Georges; Hammell, Neil; Toma, Ian; Hu, Chien-An et al. (2009): Cardiovascular inflammation and lesion cell apoptosis: a novel

connection via the interferon-inducible immunoproteasome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1213–1219.

Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.

Yi, Ping; Driscoll, Mark D.; Huang, Jing; Bhagat, Sumedha; Hilf, Russell; Bambara, Robert A.; Muyan, Mesut (2002): The Effects of Estrogen-Responsive Element- and Ligand-Induced Structural Changes on the Recruitment of Cofactors and Transcriptional Responses by ER{alpha} and ER{beta}. *Mol Endocrinol* 16, 674–693.

Ylikomi, T.; Bocquel, M. T.; Berry, M.; Gronemeyer, H.; Chambon, P. (1992): Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* 11, 3681–3694.

Yuan, Xin; Zhang, Hao; Wei, Ying-Jie; Hu, Sheng-Shou (2007): Embryonic stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction: immune privilege or rejection. *Transpl. Immunol.* 18, 88–93.

Zhang, Hong-Mei; Li, Li; Papadopoulou, Nektaria; Hodgson, Glenn; Evans, Emma; Galbraith, Matthew et al. (2008): Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. *Nucleic Acids Res.* 36, 2594–2607.

Zhang, J. C.; Woo, Y. J.; Chen, J. A.; Swain, J. L.; Sweeney, H. L. (1999): Efficient transmural cardiac gene transfer by intrapericardial injection in neonatal mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 721–732.

Zhang, T.; Wolfe, M. W.; Roberson, M. S. (2001): An early growth response protein (Egr) 1 cis-element is required for gonadotropin-releasing hormone-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 gene expression. *J. Biol. Chem.* 276, 45604–45613.

Zhao, Liqin; O'Neill, Kathleen; Diaz Brinton, Roberta (2005): Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 472–493.

## 8 Appendix

### 8.1 Medien und Lösungen

#### PBS-Puffer, wie benutzt in allen folgenden Lösungen

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4 mM

#### Lösungen für Zellkulturen

BrdU (BromodeoxyUridine)	3,074 mg/ml H <sub>2</sub> O
Penicillin G (PCN)	1600 u/mg
Streptomycin (SM)	50 mg/ml
Vitamin B12 (B12)	2 mg/ml
Insulin „I“	1 mg/ml in 10 <sup>-3</sup> M HCl
Transferrin „T“	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
BSA (bovine serum albumine)	10 g/100 ml (10%)
DNase	2 ng/ml 0,15 M NaCl
Trypsin	1,5 mg/ml
T&D (Trypsin & Dnase)	1 ml Dnase + 150 mg Trypsin / 100 ml CBFHH

#### CBFHH (calcium and bicarbonate-free Hanks with Hepes)

Komponente (MW)	g/l in stock-solution	ml stock/l CBFHH	final mM
NaCl (58,44)	200	40	137
KCl (74,55)	40	10	5,36
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	20	10	0,81
Dextrose	100	10	5,55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (136,09)	6	10	0,44
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (268,07)	9	10	0,34
Hepes, pH 7,4	47,66	100	20,06

Trypan-blue	400 mg Trypanblue +100 ml 0,15 M NaCl
Serum	Calf serum

#### Kultur-Medien für Kardiomyozyten

MEM	MEM mit PCN und B12
MEM/5	MEM mit PCN, B12, 5% calf serum
MEM/5/B	MEM mit PCN, B12, 5% calf serum, BrdU (Aussaatmedium)
MEM/TI	MEM mit PCN, B12, Transferrin, Insulin

MEM/1I/B	MEM mit PCN, B12, Transferrin, Insulin, BrdU
MEM/1I/B	MEM mit PCN, B12, Transferrin, Insulin, BSA
für Transfektionen	OptiMEM (Gibco) zu MEM im Verhältnis 1:4
FKS	BIOCHROM s-0115

Luciferase Assay

**Luciferase Assay System** Promega

**Luciferase-Substratlösung**

Tricine	20 mM
(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> x5H <sub>2</sub> O	1.07 mM
MgSO <sub>4</sub>	2.67 mM
EDTA	0.1 mM
DTT	33.3 mM
pH	7.8
Coenzyme A (lithium salt)	270 µM
Luciferin	470 µM
ATP	530 µM

**Lysereagenz 5x**

Tris, pH7.8 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt	125 mM
CDTA	10 mM
DTT	10 mM
Glycerol	50%
Triton X-100	10%

β-Galaktosidase Färbung

**Fixativ**

Glutaraldehyd 25%ig gelöst in PBS 0,05%ig

**X-Gal-Lösung**

K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	5 mM
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	5 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O,	5 mM
gelöst in PBS	
BCIG	10 mg/ml
(5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid)	
BCIG, gelöst in (N,N)-Dimethylformamide	

Verhältnis BCIG : X-Gal 1 : 9

BioRad-Protein Assay

Biorad Standard Assay BioRad 500-0006  
 Färbelösung 30% Acrylamid : n,n-Methylen-bis-acrylamid  
 (29 : 1)

Kuvetten	Sarstedt No. 67.742 (10 x 4 x 45 mm)
<u>Immunfluoreszenz</u>	
<b>Fixativ</b>	
Paraformaldehyd	2%
<b>Blockierungslösung</b>	
Triton X-100	0,5%
BSA (Bovines Serum-Albumin)	1%
zusammen gelöst in PBS	
Mowiol 40-88	SIGMA 32459-0
<b>Antikörperlösungsmittel</b>	
Tween-20 in PBS	0,15%
Anti-Troponin-Antikörper	SIGMA T 6277
DAPI	SIGMA D 9542
Phalloidin TRITC	SIGMA P1951
Ziege Anti-Maus-Antikörper FITC markiert	DIANOVA 115-095-003
<u>Quiagen-Kit zur DNA-Präparation</u>	
Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A
Puffer P2 (Lysis Puffer)	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3.0 M Kalium Azetat, pH 5.5
Puffer QBT (Äquilibriumspuffer)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Ethanol; 0,15% Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer)	1,0 M NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0; 15% Ethanol
Puffer QF (Elutionspuffer)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5;
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA
STE	100 mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA
<u>DNA-Präparation - CsCl-Methode</u>	
LB medium	10 g Bactrypton, 5 g Bactoyeast, 10 g NaCl, aqua bidest., pH 7,0
GTE- Puffer	50 mM Glucose, 25mM TrsCl ph 8, 10 mM EDTA
Lysozym	25 mg/ml in GTE
NaOH/1% SDS	0,2 M
Kalium Acetat	3 M, pH 5,5
Isopropanol	
Ethanol	100% und 70%
EthidiumBromid	10 mg/ml
TE	25 mM TrisCl ph 8, 10 mM EDTA, pH 7,5 / 0,2M NaCl



n-Butanol oder Isoamylalkohol	TE gesättigt
RNase	
CsCl	in TE (1,1g/ml)

### Transfektionen

DMRIE C-Reagenz	Gibco 10459-014
PMA (Phorbol-12 Myristat-13 Acetat)	Calbiochem 52440
Forskolin	Calbiochem B 344270
Poly-L-Lysin	SIGMA P-9155
LipofectAMINE PLUS™	GibcoBRL 10964-013
SuperFect Reagent	Quiagen
Calcium Phosphat Transfektion	Gibco

## **8.2 Abkürzungen**

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin
CBFHH	(calcium and bicarbonate-free Hanks with Hepes)
CHO	chinese hamster ovary cells
CMV	Cytomegalovirus
CPSR-1	controlled process serum replacement 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E2	17β-Östradiol
Egr-1	early growth response gene-1
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ER	estrogen receptor
ERE	estrogen response element
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoroisothiocyanat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperayin-N-2-ethansulfonat
HRT	Hormone replacement therapy
ICI	ICI 182780, Östrogenrezeptorantagonist
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
LBD	ligand binding domain
M	Molar

MAPK	mitogen activated protein kinase
MEM	minimal essential medium
min	Minute
mM	Millimolar
MHC	Myosin heavy chain
Nt	Nukleotide
PBS	phosphate buffered saline
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
Ppi	Pyrophosphat
RLU	relative light units
RNA	ribonucleic acid
RSV	Respiratory syncytial virus
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean = Standardabweichung des Mittelwertes
SDS	Sodiumdodecylsulfate
sec	Sekunde
SERM	selective estrogen receptor modulator
SRE	serum responsive element
SRF	serum response factor
TAF	transactivation factors
TBS	Tris buffered saline
TCF	ternary complex factor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TI	mit Zusatz Transferrin und Insulin
TI/B	mit Zusatz Transferrin, Insulin und BrdU
U	units
Upm	Umdrehungen pro Minute
TRITC	Tetramethylrhodamin isothiocyanate
V	Volumen
W	Watt

### 8.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agar LB	Sigma
Agarose	Serva
Ampicillin	Serva
Anti-Troponin-Antikörper	Sigma
Anti-Maus-Antikörper FITC (aus Ziege)	Dianova
BCIG	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
BrdU	Sigma
DAPI	Sigma
DH5 $\alpha$ kompetente Zellen	Gibco
N-N-Dimethylformamid	Sigma

## Appendix

---

DMEM	Gibco-BRL
DMRIE C-Reagenz	Gibco
DMSO	Sigma
DNase	DN
Ethidiumbromid	Serva
FKS	Biochrom
Forskolin	Calbiochem
Gelloading buffer	Sigma
Gentamicin	Gibco
Glycerin	Serva
Hams F12 Medium	Gibco
Hae III digest $\phi$ x-174-RF DANN	New England Biolabs
Heparin	Liquemin Roche
HEPES	Serva
Hind III digest lambda DANN	New England Biolabs
Horse Serum	Biochrom
Insulin	Serva
Küvetten (Bradford) 10x4x45mm	Sarstedt
Küvetten (DNA)	Hellma
Laminin	Sigma
Luminometerröhrchen	Sarstedt
Luciferase-Assay	Promega
MEM	Sigma
Mowiol 40-88	Sigma
Nadel 25G	Microlance
Natrium-Dodecyl-Sulphat (SDS)	Sigma
NP-40	Sigma
Objektträger	Menzel Glaser
Paraformaldehyd	Serva
Penicillin G	Sigma
Petrischalen	Falcon
Phalloidin TRITC	Sigma
Pipes	Sigma
Pipetten für Pipetus	Sterilin, Bibby
PMA	Calbiochem
Poly-L-Lysin	Sigma
Proteinbestimmungskit	Bio-Rad
Qiagen-Kit (Plasmid-Purifikation)	Qiagen
Reaktionsgefäße	Eppendorf
RNase	Sigma
Sephadex G-25	Sephadex
Skalpell	Cutfix, B.Braun
Sterilfilter	Schleicher und Schuell
Streptomycin	Sigma
TE-Puffer	Appli Chem A
Transferrin	Serva
Triton X-100	Sigma

Trypanblau	Gibco
Trypsin	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween-20	Sigma
Ultrazentrifugenröhrchen (a)	Beckmann Ultraclear
Ultrazentrifugenröhrchen (b)	Beckmann Quick Seal
Vitamin B12	Serva
12er Wells	Nunc

#### **8.4 Geräteverzeichnis**

CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Formal Scientific Stericult 200 incubator
Elektrophoresenetzgerät	Hoefer mighty slim, SX 250 power supply
Gelelektrophoresekammer	Hoefer scientific instruments, HE 99
Kulturschalen	Falcon
Luminometer	Berthold München, Lumat LB 9501
Mikroskop (Licht- und Fluoreszenz)	Zeiss Axiovert 135 mit Kamera Pentax MZ-M
pH-Meter	WTW pH 531
Pipetten	Eppendorf
Pipetus-Akkugerät	Hirschmann
Polaroidkamera	Polaroid DS 34 direct screen instant camera
Schüttler	B.Braun Biotech International Certomat H
Sonikator	Julabo USR 5
Spektrophotometer	Shimadzu, Tokio, Japan, UV 160
Sterilbank	Steril Antares 72
Sterilisator	Heraeus
Ultrazentrifuge	Beckmann Optima TL-100
Ultrazentrifugenrotor	Beckmann TLA-100.4
UV-Lampe	Biorad Transilluminator
Waage (a)	Kern 510-63
Sartorius BP	BP-61
Wasserbad	Julabo SW-20C
Zählkammer	Fa. Brand; Fuchs-Rosenthal-Kammer
Zentrifuge (a)	Beckmann centrifuge GPKR
Zentrifuge (b)	Eppendorf centrifuge 5415c

## 9 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ludwig Neyses für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit im Sonderforschungsbereich S mitzuarbeiten. Besonders hervorzuheben ist die konzeptionelle Unterstützung, die von einer unbeirrbareren Zuversicht auch in schwierigen Laborsituationen getragen war, sowie die Bereitschaft, auch unübliche Wege zur Klärung projektspezifischer Fragestellungen einschreiten zu dürfen.

In gleicher Weise möchte ich Herrn Prof. Dr. Kai Schuh für seine in jedem Augenblick bestehende Hilfsbereitschaft bei allen technischen und inhaltlichen Aspekten dieser Arbeit danken. Neben seiner hervorragenden Einführung in die Welt der Molekularbiologie waren seine Expertise mit einer enormen Portion Geduld und genügend Humor die Garantie für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Schmidt danke ich für die Übernahme des Korreferats und die Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Theo Pelzer für die unermüdliche konzeptionelle Unterstützung im Östrogenprojekt und die wohlwollende Ergebnisaufnahme.

Frau Jenny Muck für ihre hervorragenden technische Unterstützung bei allen Projektteilen und ihre Fähigkeit, jedes Problem innerhalb kürzester Zeit perfekt zu lösen und die Stimmung aller Forschenden immer auf höchstem Niveau zu halten.

Herrn Dr. Stjepan Uldrijan für seine legendäre Unterstützung, die weit über die gemeinsame Forschung hinausging.

Frau Dr. Tertia de Jager für ihr Engagement im gemeinsamen Östrogenprojekt, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei allen Schwierigkeiten und ihr steter Optimismus.

Herrn Dr. Sebastian Bauer für seine hervorragende Einführung in die geheimnisvolle Welt der Transfektion und die Kunst der Frustrationstoleranz.

Herrn Dr. Michael Schumann für seine hervorragende Einarbeitung und die unfassbare Unerschütterlichkeit in erschwerten Situationen und die ununterbrochene Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Frau Dr. Katja Nething für ihre stets aufmunternde und kollegiale Zusammenarbeit im Forschungslabor.

Herrn Bernhard Wutz für seine unzerstörbare Ruhe und gute Laune im Laboralltag und bei schier unendlichen Messreihen.

Frau Silke Maass für ihre geduldige Einarbeitung und konstante Unterstützung.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Neyses für die von Anfang an freundliche Aufnahme in das Forschungsteam und die stets entspannte Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an alle Freunde und Kollegen, die jeweils auf ihre ausgezeichnete Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Stephan Müller-Botz  
Geburtsdatum: 11.08.1974  
Geburtsort: Würzburg  
Anschrift: Straße zum Meer 9a  
17509 Lubmin

### Schulbildung:

1981-1985 Grundschule Heuchelhof  
1985-1994 Matthias-Grünwald-Gymnasium Würzburg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung:

WS 94/95 – 05/2001 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Abschluss: 3. Staatsexamen und vorläufige Approbation

### Beruflicher Werdegang:

07/2001 – 12/2002 Arzt im Praktikum der Chirurgischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik Würzburg (Chefarzt Prof. Dr. med. H. Feustel)

07/2001 – 09/2008 Assistenzarzt der Abteilung für Allgemein-/Thorax-/Visceral- und Unfallchirurgie der Missionsärztlichen Klinik Würzburg (Chefarzt Prof. Dr. med. H. Feustel bis 08/2004, anschließend Chefarzt Prof. Dr. med. H.-G. Koebe)

seit 06/2008 Facharzt für Allgemein Chirurgie

01.09.-30.09.2009 Entwicklungsarbeit in Kooperation mit dem Senior expert service (SES) im Sacred Heart Hospital Abeokuta (Nigeria)

10/2008 – 12/2009 Assistenzarzt der Abteilung für Anästhesiologie und

Intensivmedizin der Missionsärztlichen Klinik Würzburg  
(Chefarzt Dr. med. C. Kirchhoff)

seit 01/2010 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität  
Greifswald (Chefarzt Prof. Dr. med. Wendt)

**Qualifikationen:**

seit 01/2002 Fachkunde Rettungsdienst

seit 01/2004 Tätigkeit als Notarzt in Würzburg und Wertheim

seit 07/2007 Arzt für Notfallmedizin

10/2008 – 12/2009 Bestellung als Leitender Notarzt der Stadt Würzburg

2008 DIVI-Kurs Intensivtransport

10/2008 ITLS-Provider

seit 01/2010 Tätigkeit als Notarzt der Hansestadt Greifswald