

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. J.Eulert

**Kontrollmechanismus der Expression des Östrogenrezeptors Alpha - Die Nutzung
von untranslatierten Exons als alternative Startpunkte der Transkription**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Isabell Catherina Homann

aus Hannover

Würzburg, Mai 2007

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Koreferent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Die Wirkung von Östrogenen im Körper	1
1.1.1 Östrogene und Osteoporose.....	2
1.1.2 Die osteogene und adipogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter Östrogeneinfluss	3
1.2 Östrogenrezeptoren und die Superfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren.....	5
1.2.1 Erläuterung der Funktionen der Östrogenrezeptoren am Tiermodell.....	6
1.2.1.1 Bedeutung von ER α für die weibliche und männliche Fertilität	7
1.2.1.2 Die Rolle von ER α im Uterus.....	8
1.2.1.3 Auswirkungen des ER α -Verlusts auf die Entwicklung der Mamma.....	8
1.2.1.4 Bedeutung von ER α für das Wachstum, den Mineralgehalt und die Erhaltung des Knochens	8
1.2.2 Struktur und Transduktionswege des ER α	10
1.2.2.1 Genomische Signaltransduktionswege von ER α	13
1.2.2.2 Nicht-genomische Signaltransduktionswege von Östrogenen und ER α	16
1.2.3 Varianten des ER α	16
2 Fragestellung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Materialien.....	21
3.1.1 Chemikalien.....	21
3.1.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	22
3.1.3 Oligonukleotide	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Zelllinien.....	24
3.2.2 Zellkultur	25
3.2.3 Zellgewinnung und RNA-Isolierung von totaler RNA	25

3.2.4 cDNA-Synthese	26
3.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	27
3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	28
3.2.7 Sequenzierung von PCR-Produkten	28
3.2.8 Extraktion einzelner Banden aus dem Gel	30
3.2.9 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen	30
3.2.10 Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen	31
3.2.11 Adipogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen	31
4 Ergebnisse	33
4.1 Nachweis von ER α in verschiedenen Zelllinien.....	33
4.2 Die Nutzung der untranslatierten Exons durch verschiedene Zelltypen	36
4.2.1 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei Chondrozyten	40
4.2.1.1 Sequenzierung der PCR-Produkte der Chondrozyten	41
4.2.2 Nutzung der untranslatierten Exons bei mesenchymalen Stammzellen.....	44
4.2.2.1 Sequenzierung der PCR-Produkte der MSCs.....	45
4.2.3 Die Nutzung untranslatierter Exons bei hFOB Zellen.....	47
4.2.3.1 Sequenzierung der PCR-Produkte der hFOB Zellen.....	48
4.2.4 Die Nutzung untranslatierter Exons bei neuronalen Zellen.....	51
4.2.4.1 Sequenzierung der PCR-Produkte	52
4.3 Expression des ER α in verschiedenen Differenzierungswegen von mesenchymalen Stammzellen.....	54
4.3.1 Die Expression von ER α während der osteogenen Differenzierung	55
4.3.2 Die Expression von ER α während der adipogenen Differenzierung.....	56
5 Diskussion.....	58
5.1 Einleitung	58
5.2 Verwendung von hFOB 1.19, C-28/I2 und SK-N-SH als Modellsysteme.....	59
5.3 Die nested PCR im Vergleich mit anderen Methoden	60
5.4 Nachweis des ER α in den untersuchten Zelltypen	61
5.5 Die Nutzung der untranslatierter Exons bei osteoblastären Zellen	61

5.6 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei neuronalen Zellen.....	64
5.7 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei mesenchymalen Stammzellen.....	66
5.8 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei Chondrozyten.....	67
5.9 Die untranslatierten Exons des ER α	68
5.10 Die transaktivatorischen Funktionen des ER α	75
5.11 Die 46 kDa-Variante des ER α	77
5.11.1 Klinische Bedeutungen der 46 kDa Rezeptorisoform.....	80
5.12 Die Expression des ER α während der osteogenen Differenzierung.....	82
5.13 Die Expression des ER α während der adipogenen Differenzierung.....	85
6 Zusammenfassung.....	87
7 Abkürzungsverzeichnis.....	89
8 Literaturverzeichnis.....	91

1 Einleitung

1.1 Die Wirkung von Östrogenen im Körper

Östrogene spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse im menschlichen Körper. Ihre Bedeutung für die Entwicklung und Erhaltung primärer und sekundärer weiblicher Geschlechtsorgane ist schon seit Jahrzehnten bekannt [Stockard, Papanicolaou, 1917]. Erst viele Jahre später wurde der Einfluss von Östrogenen auf nicht reproduktive Organe erkannt. Im Gehirn scheinen sie außer der Regulation des neuroendokrinen Systems des Hypothalamus und der Hypophyse auch Kognition, Stimmung und Gedächtnis zu beeinflussen [McEwen et al., 1997; Fink et al., 1998]. Ihnen wird ein genereller neuroprotektiver Effekt und eine Verzögerung des Fortschreitens von Demenzen zugeschrieben.

Östrogene wirken sich auch protektiv auf das kardiovaskuläre System aus. Die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt, aber es ist bekannt, dass es unter Östrogeneinfluss zu einer Erhöhung von HDL-Cholesterin (High-Density-Lipoprotein-Cholesterin) und einer Verminderung von LDL-Cholesterin (Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin) kommt. Außerdem stimulieren Östrogene die Expression von EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) bei Verletzungen des Endothels und bewirken durch Erhöhung der Freisetzung von NO (Stickoxid) [Deroo, Korach, 2006; Farhat et al., 1996; Kauser, Rubanyi, 1997] eine kurzfristige Vasodilatation. Eine langfristige Vasodilatation verursachen sie durch Modulation der Genexpression der Prostaglandin Synthase, der NO Synthase und Endothelin [Mendelsohn, Karas, 1994; Farhat et al., 1996; Mikkola et al., 1998; Morey et al., 1998; Nickenig et al., 1998]. Das Hormon hat modulative Funktionen im Immunsystem und dem Fettstoffwechsel.

Östrogene sowie ihr Mangel sind aber auch in eine Reihe von pathologischen Prozessen involviert. So wird das Wachstum von Endometriums- und Mammakarzinomen [Auchus et al., 1994; Henderson, Feigelson, 2000; Grady et al., 1995] durch Östrogene gefördert. Durch Mangel an Östrogenen kommt es während und nach der Menopause zu einem Anstieg kardiovaskulärer Erkrankungen [Deroo, Korach, 2006] und Osteoporose.

1.1.1 Östrogene und Osteoporose

Die Osteoporose ist eine Erkrankung, die zu übermäßigem Abbau von Knochensubstanz und Knochenstruktur führt, der das ganze Skelett betrifft. Durch einen starken Verlust an spongiosen Knochen ist die Tragfestigkeit der Knochen bei der Osteoporose sehr stark eingeschränkt und es kommt bei mechanischer Beanspruchung vermehrt zu pathologischen Frakturen [Turner et al., 1994]

Ungefähr ein Drittel der Frauen sind während und nach der Menopause von Osteoporose betroffen [Denger et al., 2001]. Ursächlich scheinen neben dem eintretenden Östrogenmangel auch genetische [Zajickova, Zofkova, 2003] und konstitutionelle Bedingungen zu sein. Für eine Bedeutung des Östrogenmangels spricht auch die Tatsache, dass durch eine frühzeitige Östrogentherapie in der Menopause das Risiko der Entstehung einer Osteoporose vermindert werden kann [Rodan, Martin, 2000; Bodine et al., 1998; Robinson et al., 1997]. Bei kontinuierlicher Therapie wird auf Dauer die Gefahr von Hüftfrakturen um 50-60 % und die von Wirbelkörperbrüchen um bis zu 90 % reduziert [Notelovitz, 1997].

Östrogene führen zu einem Ausgleich zwischen Knochenneubildung und Knochenresorption und somit zu einer ausgewogenen Skelettbilanz [Turner et al., 1994]. Sie scheinen dabei bevorzugt die Knochenresorption durch Unterdrückung der Aktivität der Osteoklasten zu vermindern [Okazaki et al., 2002]. Bei der Gabe hoher Östrogendosen zeigte sich aber auch eine positive Beeinflussung der Osteoblastentätigkeit und somit eine Stärkung der Knochenneubildung [Tobias, Compston, 1999]. Die genauen Mechanismen der Beeinflussung der Osteoblastenfunktionen sind noch nicht geklärt, doch scheinen Östrogene die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten zu fördern und deren Apoptose zu verhindern. Auch eine Hochregulation der vermittelnden Rezeptoren in den mesenchymalen Stammzellen wird unter Östrogeneinfluss beobachtet [Zhou et al., 2001].

Positive Auswirkungen haben Östrogene auch auf den Vitamin D Haushalt, indem sie die Aktivität der 25-Hydroxyvitamin D1 alpha-Hydroxylase erhöhen, was zu einer gesteigerten Umwandlung des Vitamins in seine aktive Form führt [Civitelli et al., 1988].

1.1.2 Die osteogene und adipogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter Östrogeneinfluss

Bei den mesenchymalen Stammzellen (MSC) handelt es sich um selbsterneuernde und multipotente Zellen, die in der Lage sind, osteogene, chondrogene, adipogene und myogene Zellphänotypen zu generieren. Eine Differenzierung der Vorläuferzellen in eine dieser Zelltypen wird durch spezifische genetische Programme gesteuert und führt zu einer Expression von Proteinen, die für die zellspezifische Funktion benötigt werden. Die Aktivierung dieser genetischen Programme wird durch extrazelluläre Faktoren kontrolliert und durch Zytokine transduziert. Das genaue Zusammenspiel dieser Faktoren, die spezifischen Charakteristika der mesenchymalen Stammzellen, die stadienspezifischen Veränderungen, die sich in den einzelnen Differenzierungsschritten abspielen und die biologischen Kontrollen, die zur linearen Progression oder zur Differenzierung in einen Zellphänotyp führen, sind aber noch unzureichend bekannt [Oreffo et al., 1999].

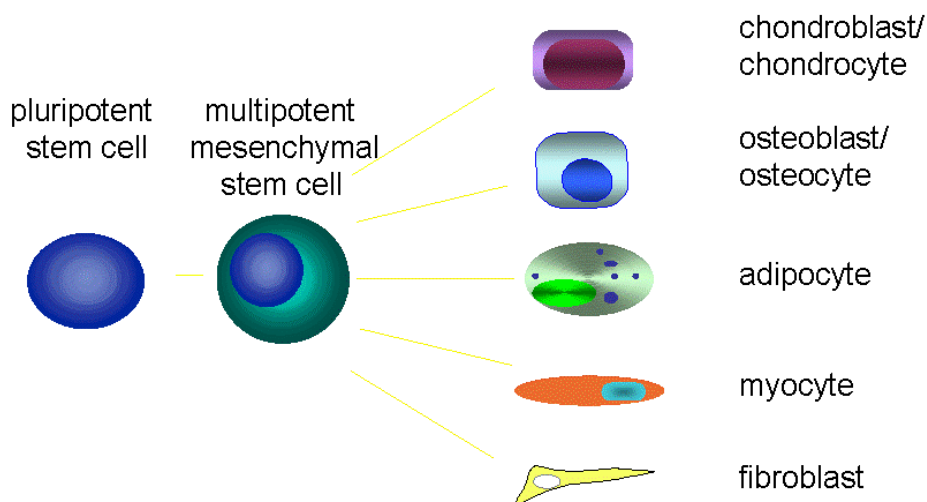


Abbildung 1: Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Während der Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen kommt es zu einer Expression von zelllinienspezifischen Transkriptionsfaktoren, die zu einem differenzierten Phänotyp führen. Adipozyten speichern Fetttropfen, Chondrozyten scheiden eine Kollagen Typ II extrazelluläre Matrix aus, während Osteoblasten eine Kollagen Typ I Matrix ablagern

Die osteoblastäre Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen ist bereits in zahlreichen *in vitro* Studien untersucht worden. Dabei konnte eine spezifische Abfolge der Marker des osteoblastären Phänotyps beobachtet werden: Zunächst kommt es zu einer Akkumulation der kollagenösen Matrix, dann zu einer Expression von alkalischer Phosphatase und schließlich zu einer Sekretion von Osteocalcin und zur Mineralisation von Knochenkernen [Stein, Lian, 1993]. Als Marker des adipogenen Phänotyps wurden die Expression von Adipozytenprotein 2 (AP 2) und Lipoproteinlipase (LPL) beschrieben [Dang et al., 2002]. Die Identifikation dieser phänotypischen Marker ist eine entscheidende Voraussetzung, um eine Einflussnahme von Steroiden wie beispielsweise Östrogenen auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen untersuchen zu können.

Die Bedeutung von Östrogenen für die Knochenphysiologie wird bei Untersuchungen an ovariectomierten Mäusen deutlich. Bei diesen Mäusen kommt es zu einer signifikanten Abnahme des trabekulären Knochens. Dieser Effekt kann durch eine anschließende Östrogensubstitution nicht nur aufgehoben werden, es kommt sogar zu einer vermehrten Neubildung von Knochen [Zhou et al., 2001]. Diese protektive Wirkung der Östrogene wurde zunächst ausschließlich der Inhibition der Osteoklasten zugeschrieben [Okazaki et al., 2002]. Tatsächlich konnte durch *in vitro* Studien eine Verminderung der Produktion von osteoklastischen Zytokinen und eine Erhöhung der Expression von inhibitorischen Faktoren der Osteoklastogenese nachgewiesen werden [Manolagas, Jilka, 1995; Spelsberg et al., 1999; Saika et al., 2001]. Da die weiter oben beschriebene Zunahme an Knochenbildung unter Östrogensubstitution aber die Proliferation und Differenzierung von osteoblastischen Vorläuferzellen voraussetzt, wird mittlerweile vermutet, dass Östrogene auch eine regulative Wirkung auf die Aktivität von mesenchymalen Stammzellen und die osteogene Differenzierung dieser Zellen ausüben [Zhou et al., 2001].

Die Assoziation einer Zunahme der Lipidakkumulation im Knochenmark mit einem altersabhängigen Knochenverlust [Burkhardt et al., 1987; Nuttall, Gimble, 2000; Gimble et al., 1996; Meunier et al., 1971; Rozman et al., 1989] spricht außerdem für eine entgegengesetzte Partnerschaft der Adipo- und Osteoblastogenese [Okazaki et al., 2002; Nuttall et al., 1998; Park et al., 1999; Beresford et al., 1992]. Für eine Beeinflussung dieser Partnerschaft durch Östrogene zugunsten der Osteogenese spricht die klinische Beobachtung, dass es unter Östrogenmangel wie bei Frauen in der Postmenopause oder

ovarektomierten Tieren zu einer Vermehrung der Adipozyten kommt [Pedersen et al., 1991; Gambacciani et al., 1997]. Bis heute ist aber noch unklar, ob Östrogene die Differenzierung der Vorläuferzellen in Osteoblasten und Adipozyten direkt regulieren [Dang et al., 2002]. Auch die Expression des Östrogenrezeptors Alpha (ER α) während der osteoblastären Entwicklung und die Einflussnahme von Östrogenen auf einzelne Differenzierungsschritte dieses Zellphänotyps werden kontrovers diskutiert [Qu et al., 1998; Bodine et al., 1998; Okazaki et al., 2002].

1.2 Östrogenrezeptoren und die Superfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren

Der Einfluss von Östrogenen auf physiologische und pathologische Prozesse wird in den meisten Fällen durch Östrogenrezeptoren vermittelt. Man unterscheidet Östrogenrezeptor Alpha (ER α) und Östrogenrezeptor Beta (ER β). Die Östrogenrezeptoren zählen gemeinsam mit den Glukokortikoidrezeptoren, den Thyroidrezeptoren, den Vitamin D Rezeptoren, den Androgenrezeptoren, den „orphan“ Rezeptoren ohne bekannte Liganden und vielen anderen zur Superfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren. Diese Rezeptorsuperfamilie wird in vier Klassen unterteilt, die sich in ihren Interaktionen mit heat-shock Proteinen, ihrer Neigung Hetero- oder Homodimere zu bilden und ihrer DNA-Bindung unterscheiden. Die Östrogenrezeptoren zählen zur Klasse I, die durch eine lange A/B-Domäne gekennzeichnet ist (Östrogenrezeptoren, Glukokortikoidrezeptoren, Mineralokortikoidrezeptoren, Progesteronrezeptoren, Androgenrezeptoren). Die Rezeptoren der Klasse I liegen bei Abwesenheit ihrer Liganden als 9S Heterokomplexe zusammen mit heat-shock Proteinen, Immunophilinen und anderen Chaperonen vor [Pratt, Toft, 1997; Knoblauch, Garabedian, 1999]. Sie wandern entweder kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Nukleus hin und her [Defranco et al., 1995] oder befinden sich dauerhaft in einem der beiden Kompartimente. Nach Ligandenbindung ändern die Rezeptoren ihre Konformation und die gebundenen Kofaktoren dissoziieren. Die Rezeptoren können jetzt dimerisieren, in den Nukleus translozieren und an hormonresponsive Elemente der DNA binden, um dort die Transkriptionsrate von Zielgenen zu verändern [Dechering et al., 2000].

ER α und ER β sowie alle anderen Mitglieder der nukleären Rezeptorsuperfamilie haben einen ähnlichen Strukturaufbau mit unterschiedlichen Funktionsdomänen. Die Gene der beiden Östrogenrezeptoren kodieren in unterschiedlichen Lokalisationen. Während ER α

auf Chromosom 6 an Position 6q25.1 liegt [Menasce et al., 1993], wurde die codierende Sequenz für ER β an der Verbindungsstelle zwischen 14q11.1 und 14.11.2 auf Chromosom 14 gefunden [Enmark et al., 1997].

Eine gleichzeitige Existenz von ER α und ER β wurde in einer Reihe von Geweben festgestellt. Sie werden in reproduktiven Organen wie Ovarien, Uterus und Mamma [Sacca et al., 1988; Shupnik et al., 1989; Revelli et al., 1996] sowie im Knochen [Oursler et al., 1991; Ikegami et al., 1994], dem Immunsystem, dem Gehirn [Shupnik et al., 1989; Simerly, Young, 1991; Shughrue et al., 1992; Kuiper et al., 1997] und dem kardiovaskulären System [Mizutani et al., 1994; Bayard et al., 1995; 34-36] exprimiert. Es blieb lange unklar welcher Rezeptor im jeweiligen Gewebe die physiologischen oder pathologischen Östrogenwirkungen vermittelt und ob die Rezeptoren synergistisch oder antagonistisch agieren. Mögliche Antworten auf diese Fragen erhielt man durch die Generierung von Mausstämmen mit funktioneller Inaktivierung oder Überexpression jeweils eines Östrogenrezeptors (KOMaus/ transgene Maus).

1.2.1 Erläuterung der Funktionen der Östrogenrezeptoren am Tiermodell

Um Anhaltspunkte für das Zusammenspiel bzw. den Antagonismus von ER α und ER β *in vivo* in verschiedenen Organen zu erhalten, wurden Knockout Mäuse (KOMaus) generiert. Hierbei handelt es sich um Mäuse, bei denen entweder ER α , ER β oder beide Östrogenrezeptoren durch genetische Manipulation funktionell inaktiviert wurden. Die ersten Berichte über Knockout-Mäuse stammen von Korach und Smithies, die einen ER α Knockout durch Beeinflussung von Exon 2 herstellten [Couse et al., 1995]. Dieser Knockout war allerdings nicht komplett, da durch Spleißvorgänge die veränderte Sequenz eliminiert und ER α weiterhin translatiert werden konnte [Denger et al., 2001]. Die Versuche, die mit diesen ersten Knockout Mäusen durchgeführt wurden, resultierten deshalb in einer Fehleinschätzung der Bedeutung des ER α für physiologische und pathologische Prozesse. ER α schien unbedeutend zu sein.

Jahre später wurde ER β das erste Mal in den Laboren von Korach, Gustafsson und Smithies durch Veränderungen an Exon 3 inaktiviert [Krege et al., 1998]. Weil ER β aber Varianten exprimiert, bei denen Exon 3 oder Exons 3 und 4 übersprungen werden, wurde auch bei diesem Knockout residuale mRNA gefunden. Dieser mRNA fehlte allerdings die DNA-bindende Domäne und in Detektionsversuchen mit Immunhistoche-

mie konnte kein ER β Protein nachgewiesen werden. Der ER β Knockout scheint somit komplett zu sein (ER β KO).

Um auch ER α komplett auszuschalten, wurde anschließend im Labor von Chambon ein Knockout mit inaktiviertem Exon 3 versucht [Dupont et al., 2000]. In den nachfolgenden Versuchen wurde keine ER α mRNA identifiziert. Ein kompletter Knockout schien gelungen (ER α KO). Die beiden kompletten Knockouts wurden miteinander kombiniert und ein doppelter Knockout erreicht (ER $\alpha\beta$ KO).

Die Knockout Mäuse wurden anschließend bezüglich organischer Veränderungen und Verhaltensabweichungen untersucht. Dabei zeigten sich die ausgeprägtesten Unterschiede zur Wildtyp Maus in den reproduktiven Organen und Regelkreisen.

1.2.1.1 Bedeutung von ER α für die weibliche und männliche Fertilität

Sowohl weibliche als auch männliche ER α KO- und ER $\alpha\beta$ KO-Mäuse sind infertil [Hewitt et al., 2000]. Die männlichen ER β KO-Mäuse zeigen eine normale Fertilität, während bei den weiblichen transgenen Mäusen eine verminderte Fertilität durch Störungen der Ovulation zu beobachten ist.

Ein Grund für die komplette Infertilität der weiblichen ER α KO-Mäuse scheint eine Störung des Regelkreises zwischen Hypophyse und Ovarien zu sein. Normalerweise besteht ein negatives Feedback zwischen Östrogenproduktion der Ovarien und der LH-Ausschüttung der Hypophyse. Dieser Feedback Mechanismus scheint durch ER α vermittelt zu werden, da er bei der ER α KO Maus unterbrochen ist und die Hypophyse unkontrolliert LH überproduziert. Als Antwort auf die chronisch erhöhten LH-Serumwerte kommt es zu einer vermehrten Östrogenproduktion der Ovarien, zu einer ständigen Testosteronüberproduktion und zu einem chronischen basalen präovulatorischen Progesteronspiegel [Hewitt et al., 2000]. Die hohen LH-Spiegel im Serum und die veränderten endokrinen Parameter führen zu einer Phänotypveränderung der Ovarien, bestehend aus einer Vergrößerung und der Bildung hämorrhagischer Zysten [Hewitt et al., 2000]. Reife Follikel und Corpora lutea findet man nicht. Unter diesen Bedingungen kann keine Ovulation stattfinden.

Bei den männlichen ER α KO ist eine fehlende Spermienreifung zu beobachten [Eddy et al., 1996]. Dies ist neben einem gestörten Paarungsverhalten, das auch weibliche ER α KO Mäuse zeigen, der Grund für die Infertilität der männlichen Mäuse. Untersu-

chungen zeigten, dass die Funktion der Spermien an sich nicht eingeschränkt ist [Maha-to et al., 2000].

1.2.1.2 Die Rolle von ER α im Uterus

Normalerweise bereitet sich der Uterus in der präovulatorischen Phase durch Proliferation seines Endometriums auf die bevorstehende Implantation vor. Diese Proliferation ist eine Reaktion auf hohe Östrogenwerte im Serum. Der Uterus der ER α KO Maus ist zu einer derartigen Reaktion trotz erhöhter Östrogenwerte nicht in der Lage. Er ist und bleibt während des gesamten Zyklus hypoplastisch und gleicht somit einem präpubertären Uterus [Lubahn et al., 1993; Couse et al., 1999]. Neben den ovariellen Veränderungen ist auch der Phänotyp des Uterus für die Infertilität der weiblichen transgenen Maus verantwortlich.

Die zyklischen Veränderungen des Uterus bei der ER β KO Maus entsprechen denen bei der reifen Wildtyp Maus und sind somit normal.

1.2.1.3 Auswirkungen des ER α -Verlusts auf die Entwicklung der Mamma

Die Brustdrüse der Maus besteht bei der Geburt aus einem epithelialen duktalem Rudiment. Dieses verlängert sich während der Reifung unter Östrogeneinfluss und verzweigt sich zu alveolären Knospen unter Progesteroneinfluss. Bei der ER α KO Maus verbleibt die Brustdrüse der Maus im rudimentären Zustand und verlängert sich nicht [Couse, Korach, 1999]. Die Entwicklung der Brustdrüse verläuft bei der ER β KO Maus normal.

1.2.1.4 Bedeutung von ER α für das Wachstum, den Mineralgehalt und die Erhaltung des Knochens

Die Bedeutung der Östrogenrezeptoren für das Knochenwachstum und die Knochenmineralisierung wird kontrovers diskutiert. Gründe für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse mit Knockout Mäusen könnten neben der Verwendung inkompletter Knockouts auch die geringe Anzahl an Versuchstieren in einigen Versuchsreihen und die Überstimulationen der Rezeptoren durch sehr hohe Östrogenspiegel sein. Die Modulation

der Östrogenwirkungen durch Östrogenrezeptoren im Knochen scheint außerdem speziesspezifisch zu sein. Es ist deshalb fraglich, ob man die Ergebnisse der Mausmodelle mit den Wirkungen im menschlichen Körper gleichsetzen kann.

Anhaltspunkte für die Bedeutung des ER α für den Mann ergaben Untersuchungen an einem Mann, dem funktionelles ER α -Protein fehlte [Smith et al., 1994] und zwei Männern, die durch Mutationen im Aromatasegen nicht in der Lage waren, Testosteron in Östradiol umzuwandeln [Morishima et al., 1995; Carani et al., 1997]. Bei diesen Männern trat kein Schluss der Epiphysenfugen ein und sie erreichten eine überdurchschnittliche Körpergröße [Smith et al., 1994]. Dabei litten sie an Osteoporose und einer verminderten Mineralisierung ihrer spongiösen Knochen. Während bei dem Mann mit fehlendem ER α -Protein keine Reaktion auf Östrogene auszulösen war, konnte bei den Männern mit mutierter Aromatase unter Östrogensubstitution ein Epiphysenschluss erzielt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen am Menschen zeigten die männlichen ER α KO Mäuse verkürzte Knochen in Korrelation mit verminderten IGF-1 Serumwerten [Vidal et al., 1999]. Übereinstimmende Ergebnisse zwischen Mensch und Maus wurden bei der Mineraldichte der Knochen gefunden, die auch bei der Maus vermindert war. Da sich zwar beim Menschen, nicht aber bei der Maus die Epiphysenfugen nach der Pubertät schließen, konnten die Effekte der Östrogenrezeptoren in diesem Bereich nicht am Mausmodell nachvollzogen werden [Vidal et al., 1999].

Da es bis jetzt noch keine Frau mit inaktiviertem ER α oder ER β gegeben hat, mussten Mausmodelle zur Interpretation ihrer Bedeutungen für das weibliche Knochenwachstum herangezogen werden [Vidal et al., 1999]. Der Verlust von ER α zeigte bei den weiblichen Mäusen vor und während der Pubertät keine Veränderung des Knochenwachstums. Erst bei der reifen Maus war eine Verkürzung der Röhrenknochen zu erkennen, während die Länge der platten Knochen mit den Daten der Wildtyp-Maus übereinstimmte. Das verminderte Röhrenknochenwachstum der Mäuse war mit erniedrigten IGF-1 Serumwerten korreliert [Vidal et al., 1999].

Im Bezug auf die Erhaltung des kortikalen Knochens während des Erwachsenenalters der Maus scheinen Östrogenrezeptoren als Antagonisten zu wirken. Während die ER α KO Maus eine verkürzte Femurlänge und verminderte Mineraldichte zeigte [Vidal et al., 2000; Vidal et al., 1999], wurden bei der weiblichen ER β KO Maus erhöhte Werte der kortikalen Mineraldichte und des Knochenumfangs beobachtet [Windahl et al.,

2002]. Diese Beobachtungen sprechen für einen protektiven Effekt von ER α und eine repressive Wirkung von ER β auf den Erhalt des Knochens in der Postmenopause.

1.2.2 Struktur und Transduktionswege des ER α

Bei ER α handelt es sich um ein lösliches thermolabiles Protein, das leicht durch Proteasen zerstört werden kann [Jensen, DeSombre, 1972]. Er liegt auf Chromosom 6 an Position 25.1 und besteht aus 8 codierenden Exons, die eine Größe von ungefähr 140 kb haben [Ponglikitmongkol et al., 1988]. Diese 8 Exons lassen sich 6 Funktionsdomänen des Proteins zuordnen (A-F), die denen der anderen Rezeptoren aus der Familie der nukleären Transkriptionsfaktoren ähnlich sind. Am N-Terminus des ER α liegt die Länge und Sequenz variable A/B-Domäne. Sie beinhaltet eine ligandenunabhängige transaktivierende Funktion (AF-1), die in der Lage ist, in Abwesenheit bindender Liganden an Koaktivatoren zu assoziieren und die Transkription von Zielgenen zu modulieren. Obwohl diese Funktion unabhängig von bindenden Agonisten ist, kann sie durch Antagonisten blockiert werden.

Die folgende hydrophile C-Domäne beinhaltet zwei Zinkfinger motive, durch die der Östrogenrezeptor mit hoher Affinität an Östrogen responsive Elemente (ERE) binden kann, die in regulatorischen Regionen der Zielgene liegen. Bei den ERE handelt es sich um eine aus 15 Basenpaaren bestehende umgekehrt repetitive Sequenz (TGGTCAnnnTGACCA) [Beato, 1989], an die der ER α als Dimer bindet [Glass, 1994]. Hierbei lagert sich der eine ER α an die eine aus 6 Basenpaaren zusammengesetzte repetitive Sequenz an, der andere an die entgegengesetzte [Klinge, 2001]. Neben dieser DNA-bindenden Funktion fördert die durch Exons 2-3 kodierte C-Domäne die Dimerisierung des ER α in Abwesenheit von bindenden Liganden.

Die nächste Funktionsdomäne des ER α wird drehbare oder hypervariable D-Domäne genannt. Sie ermöglicht es dem Rezeptor sich zu biegen, nach Ligandenbindung die Konformation zu ändern und trägt zur Translokation des Rezeptordimers in den Nukleus bei.

Die auf Exons 4-8 liegende E-Region bildet die Liganden-bindende Domäne (LBD) [Mangelsdorf, Evans, 1995], die aus 12 α -Helixen und zwei kurzen β -Faltblättern besteht [Dechering et al., 2000]. Diese Domäne ist für die Spezifität des ER α verantwortlich. Sie ermöglicht eine Bindung des östrogenen Liganden mit höchster Affinität, aber

durch die Verwandtschaft mit anderen nukleären Rezeptoren auch die Bindung ihrer Liganden mit niedrigerer Affinität. Die Liganden-bindende Domäne beinhaltet Regionen, die eine Dimerisierung des Rezeptors [Forman, Samuels, 1990], Interaktionen mit heat-shock Proteinen [Pratt, Toft, 1997] und mit Korepressoren und Koaktivatoren [Savkur, Burris, 2004; Horwitz et al., 1996] ermöglichen. Zusätzlich zu diesen Funktionen ist die E-Region in die ligandenabhängige transkriptionale Aktivität involviert (AF-2). Von entscheidender Bedeutung für diese AF-2 Funktion ist Helix 12. Diese ändert bei agonistischer oder antagonistischer Ligandenbindung in unterschiedlicher Weise ihre Konformation. Nach Bindung eines Agonisten an den Rezeptor verschließt sie die Liganden-Bindungs-Tasche wie ein Deckel [Egea et al., 2000] und ermöglicht so eine Koaktivatorenbindung an die AF-2 Helix [Darimont et al., 1998; Gampe et al., 2000; Nolte et al., 1998; Shiau et al., 1998; Mueller-Fahrnow, Egner, 1999]. Im Falle eines antagonistischen Liganden konkurriert Helix 12 mit Koaktivatoren um die gleiche Bindungsstelle und unterbindet so die transaktivatorische Funktion.

ER α besitzt am Carboxyl-Terminus eine große, aus 42 Aminosäuren bestehende F-Domäne. Diese Domäne unterscheidet die Östrogenrezeptoren in ihrem funktionellen Aufbau von den anderen nukleären Rezeptoren, denen Domäne F fehlt. Im Gegensatz zu Domäne C oder Domäne E zeigt Domäne F nur wenige Übereinstimmungen zwischen ER α und ER β [Enmark et al., 1997]. Bei ER α beeinflusst sie die transkriptionale Aktivierung sowie die Bindung von Koregulatoren und vermittelt die repressiven Aktivitäten der Antiöstrogene. Nach Bindung eines agonistischen Liganden wirkt sich die F-Domäne inhibitorisch auf das Dimerisierungssignal der E-Region aus [Peters, Khan, 1999].

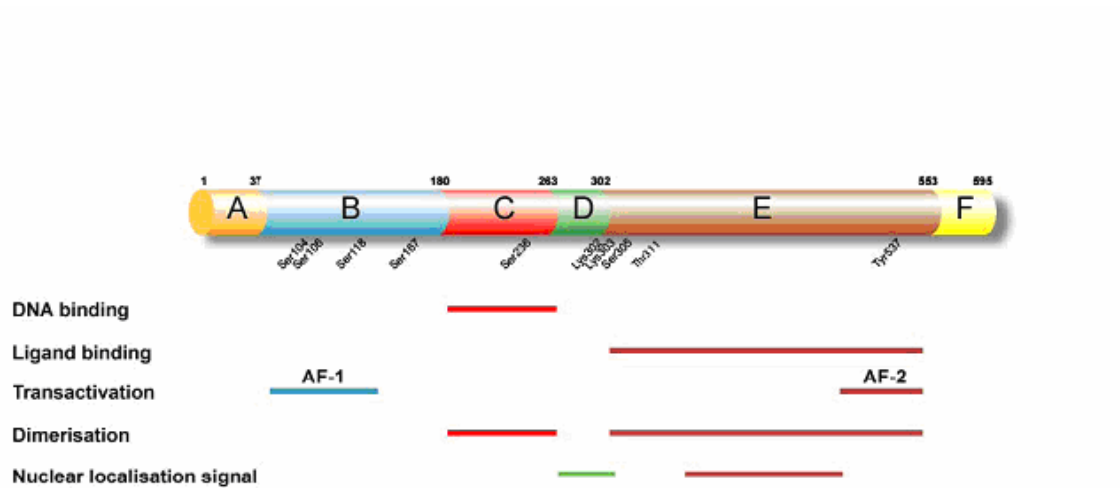
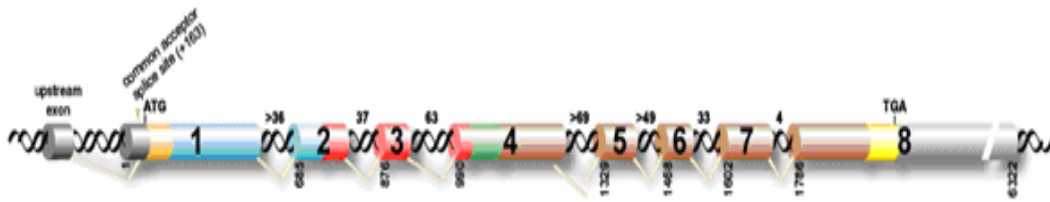


Abbildung 2 und 3: Genomische Organisation der kodierenden Region und Funktionsdomänen des Östrogenrezeptors Alpha

Die verschiedenen Domänen des ER α werden mit ihren Funktionen dargestellt: Der ER α wird durch acht Exons kodiert und beinhaltet sechs Funktionsdomänen (A-F). Der ER α besitzt eine ligandenabhängige (AF-2) und eine ligandenunabhängige transaktivierende Funktion, die an Koaktivatoren binden und die Transkription von Zielgenen modulieren können. Die ligandenunabhängige transaktivierende Funktion (AF-1) befindet sich in der A/B-Domäne, die ligandenabhängige transaktivierende Funktion (AF-2) in der E-Domäne. Die C-Domäne beinhaltet zwei Zinkfinger motive, durch die ER α an DNA binden kann. Die drehbare D-Domäne ermöglicht es dem Rezeptor sich zu biegen und nach der Ligandenbindung seine Konformation zu ändern. Die auf Exons 4-8 liegende E-Region bildet die Liganden-bindende Domäne (LBD). Sie ermöglicht eine Bindung des östrogenen Liganden mit höchster Affinität (nach Reid et al., 2002).

1.2.2.1 Genomische Signaltransduktionswege von ER α

In Abwesenheit bindender Liganden liegt der ER α monomerisch und assoziiert an heat-shock Proteine HSP70 und HSP90 vor und pendelt zwischen Zytoplasma und Nukleus. Sobald ein agonistischer oder antagonistischer Ligand an den Rezeptor bindet, ändert er in unterschiedlicher Weise seine Konformation. Im Falle eines agonistischen Ligandens führt die Konformationsänderung zu einer Dissoziation der heat-shock Proteine [Pratt, Toft, 1997] und einer Freigabe der Dimerisierungs- und AF-2-Funktion [Beekman et al., 1993]. Der ER α bildet Homo- und Heterodimere. Das entstandene Rezeptordimer transloziert in den Nukleus, bindet an EREs und rekrutiert Koregulatoren vor und nach Bindung an die DNA. Abhängig von Zelltyp und Ligand binden verschiedene Koregulatoren an die beiden transaktivatorischen Funktionen AF-1 und AF-2. Da AF-1 eine ligandenunabhängige und AF-2 eine ligandenabhängige Funktion ist, können beide auch einzeln die Transkription der Zielgene regulieren. Bei den meisten Promotoren der Zielgene wird allerdings ein Synergismus der beiden Funktionen zur optimalen Beeinflussung der transkriptionalen Aktivität benötigt [Kraus et al., 1995]. Die beiden Funktionen erzielen ihre Wirkung am Promotor über unterschiedliche Mechanismen. Ein Grund hierfür könnte eine Interaktion mit verschiedenen Komponenten des Initiationskomplexes sein [McDonnell et al., 1995; Hong et al., 1997].

Eine Vielzahl von Koregulatoren interagiert mit den AF-Funktionen des ER α und bewirkt gemeinsam mit den gebundenen Liganden entweder eine Inhibierung oder eine Induktion der Transkription. Zu den Koregulatoren der beiden Östrogenrezeptoren zählen zum Beispiel die Mitglieder der p160 Familie, p300/CBP, DRIP/ARC/TRAP Komplexe und der Koaktivator SRC-1, der sowohl mit AF-1, als auch mit AF-2 beider Rezeptoren interagiert und somit den Synergismus der beiden Funktionen verstärkt. Nach ihrer Bindung acetylieren und phosphorylieren die Koregulatoren die basalen Transkriptionsfaktoren und bewirken eine Remodellierung des Chromatins in der Promotorregion [Chen et al., 2001]. Die Acetylierung der Histone erleichtert es anderen Kofaktoren an die ERE zu binden [Imhof et al., 1997; Fraser et al., 1998]. Eine wichtige Aufgabe der Koaktivatoren ist auch die Rekrutierung der RNA Polymerase II zur Promotorregion, deren Anwesenheit eine Voraussetzung für die Transkription ist.

Neben der Regulation der Expression von Zielgenen über die Bindung an ERE ist der ER α in der Lage, die Transkription von Genen zu beeinflussen, die keine responsiven

Elemente besitzen. Die Interaktion mit diesen Genen findet über Protein/Protein Bindungen statt. Ein Beispiel für eine derartige Interaktion des ER α findet man beim Insulin-like growth factor (IGF-1) Gen. AP-1-Elemente, die einen fos/jun-Dimer gebunden haben, ermöglichen es dem Rezeptor an die DNA zu binden, was zu einer Aktivierung durch AP-1 führt [Kushner et al., 2000]. Um die Aktivität des AP-1-Elements zu beeinflussen ist die Bindung beider AF-Funktionen notwendig.

Der ER α reguliert auch die Expression von Genen wie c-FOS und TGF α , die keine vollständige ERE-Sequenz besitzen. Diese Regulation erfolgt über Interaktionen zwischen ER α und SP1 Proteinen, die zur Hälfte an ERE-Regionen binden und zur anderen Hälfte an GC-reiche Sequenzen [Safe, 2001].

Eine Initiation der Transkription von Zielgenen kann auch durch Interaktionen des ER α mit Membranrezeptoren, zytoplasmatischen Signalkaskaden oder Proteinkinasen erreicht werden. Diese Interaktionen sind Zell- und Promotor-spezifisch. Ein Beispiel für eine Interaktion des ER α mit einem Membranrezeptor und einer Signalkaskade ist der Feedback-Mechanismus zwischen ER α und dem Wachstumsfaktorrezeptor bzw. den Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPKs). Die MAPKs bestehen aus verschiedenen Familien. Beispiele sind Erk, Jun N-terminale Kinase (Jnk) und p38 Kinase. Während die Erk Familie durch Wachstumsfaktoren über ihren membranständigen Rezeptor aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung von Jnk und p38 MAPK über Stressstimuli. Der MAPK-Signalweg setzt sich aus drei Kinasen zusammen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden [Widmann et al., 1999].

Die Bindung eines Wachstumsfaktors an den Rezeptor bewirkt die Aktivierung einer Erk Kinase, die den ER α an Ser 118 phosphoryliert. Diese Aktivierung des Rezeptors findet Liganden abhängig und unabhängig statt. Die Phosphorylierung des Rezeptors fördert seine transkriptionale Aktivität und verbessert seine Fähigkeit zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren [Kato et al., 2000; Bunone et al., 1996; Clark et al., 2001]. Neben dem ER α phosphoryliert die Erk Kinase auch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren [Font de Mora, Brown, 2000; Lopez et al., 2001]. Die aktivierten Faktoren wiederum regulieren die Transkription ihrer Zielgene und ermöglichen es Östrogenen, die Expression von Genen zu modulieren, die keine ERE besitzen.

Im Gegenzug kann der ER α sowohl die Erk Familie als auch den Wachstumsfaktorrezeptor aktivieren. Um eine Aktivierung dieser beiden Komponenten hervorzurufen bin-

det ER α entweder an transmembrane Proteine (Caveolae) oder an den Wachstumsfaktorrezeptor selbst. Über seine Bindung an die Membran kann er die Erk Familie innerhalb von 10 Minuten aktivieren [Harvey et al., 2002]. Den Wachstumsfaktorrezeptor beeinflusst er durch Assoziation und anschließende Phosphorylierung [Kahlert et al., 2000].

Auch andere Signalkaskaden beeinflussen die Aktivität von ER α . So führt die p38 MAPK zu einer ligandenabhängigen Verstärkung der transkriptionalen Aktivität von ER α [Chen et al., 1999; Russell et al., 2000; Watters et al., 1997]. Die PKA, eine cAMP abhängige Proteinkinase und die PKC δ , eine Ca $^{2+}$ abhängige Proteinkinase führen zu einer Aktivierung von ER und Koregulatoren durch Phosphorylierung [Harvey et al., 2002].

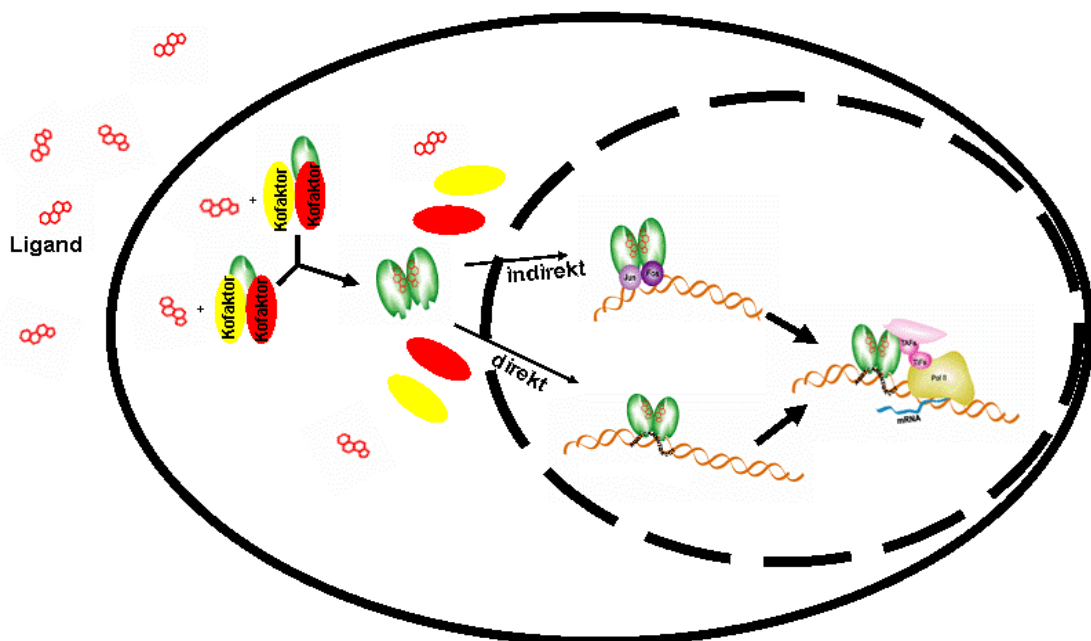


Abbildung 4: ER α kann östrogenabhängige Gene sowohl direkt als auch indirekt transaktivieren. In Abwesenheit bindender Liganden liegt der ER α als Monomer und assoziiert an heat-shock Proteine HSP70 und HSP90 vor und pendelt zwischen Zytoplasma und Nukleus. Sobald ein agonistischer oder antagonistischer Ligand an den Rezeptor bindet, ändert er in unterschiedlicher Weise seine Konformation. Im Falle eines agonistischen Ligandens führt die Konformationsänderung zu einer Dissoziation der heat-shock

Proteine und einer Freigabe der Dimerisierungs- und AF-2-Funktion. Der ER α bildet Homo- oder Heterodimere und transloziert in den Nukleus. Der durch Ligandenbindung aktivierte ER α kann die Transkription von Zielgenen entweder durch direkte Bindung an diese Gene aktivieren oder indirekt durch Assoziation mit AP-1 (hier als jun/fos Heterodimer illustriert). In beiden Fällen rekrutiert der aktivierte ER α Kofaktoren, die zu einer Aktivierung der Transkription führen und die lokale Chromatinstruktur modifizieren (modifiziert nach Reid et al., 2002).

1.2.2.2 Nicht-genomische Signaltransduktionswege von Östrogenen und ER α

Neben der Induktion von Transkription und Translation von Zielgenen, die 4-8 Stunden beansprucht [Razandi et al., 2000], sind Östrogene in eine Vielzahl von schnellen und kurzlebigen Effekten involviert. Hierzu zählen die Beeinflussung von Ionenflüssen, die Absorption und Sekretion von Substraten und die Aktivierung von zytoplasmatischen Signalkaskaden und Proteinkinasen innerhalb weniger Minuten. Diese schnellen Effekte von Östrogenen wurden bisher hauptsächlich im weiblichen Geschlecht ausgemacht, was für eine Geschlechtsspezifität sprechen könnte [Harvey et al., 2002].

Beispiele für eine nicht-genomische Beeinflussung von Funktionen in verschiedenen Zelllinien durch Östrogene sind Veränderungen von Calciumflüssen in Neuronen [Kelly, Levin, 2001], die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Absorption und Sekretion zugunsten der Absorption im distalen Kolon [McNamara et al., 1995] oder Veränderungen des Zellwachstums [Castoria et al., 1999]. Die schnellen Östrogeneffekte werden durch verschiedene zytoplasmatische Signalkaskaden und Proteinkinasen wie die MAPK, die PKA, die PKC α oder die PKC δ vermittelt [Harvey et al., 2002]. Diese Effekte lassen sich in Antiöstrogen sensitive und insensitive unterteilen. Ein Teil der schnellen Effekte des Östrogens scheint somit über die „klassischen“ Rezeptoren vermittelt, ein anderer aber über andersartige, noch nicht näher bestimmte membranständige Rezeptoren initiiert zu werden.

1.2.3 Varianten des ER α

Im menschlichen Körper wird eine Vielzahl von Varianten und Isoformen von mRNAs der Steroidhormonrezeptoren exprimiert. Ursachen für die Entstehung dieser Varianten sind Veränderungen im Gen selbst oder die Nutzung alternativer Mechanismen während und nach der Transkription. Substitution oder Deletion von Nukleotiden sowie Verände-

rungen in der Anzahl der Wiederholungen in der Trinukleotid repetitiven Region sind Veränderungen im Gen selbst, die Varianten der mRNA hervorrufen. Die Isoformen, die im Verlauf der Transkription und im nachfolgenden Splicing-Prozess entstehen, werden in 7 Subtypen unterteilt, die durch unterschiedliche Mechanismen entstehen:

Typ 1: Alternative Nutzung multipler Transkriptionsstartpunkte

Typ 2: Deletion ganzer Exons oder eines Teils eines Exons durch alternatives Spleißen

Typ 3: Duplikation von Exons

Typ 4: Alternative Nutzung von 5'-untranslatierten Exons

Typ 5: Alternative Nutzung von mehreren kodierenden Exons

Typ 6: Nutzung von intronischen Exons und einem Teil der kodierenden Exons (Exons 4-8 oder Exons 5-8)

Typ 7: Einfügung eines intronischen Exons oder einer Intronregion

Varianten des Östrogenrezeptors entstehen durch Nutzung von Typ 2, 3, 4 und 6 [Hirata et al., 2003].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung von mRNA-Varianten des ER α durch alternative Nutzung von 5'-untranslatierten Exons als Startpunkte der Transkription. Diese alternative Nutzung anderer Kontrollregionen (Promotoren) erlaubt vor dem Transkriptionsstart andere DNA-bindende Faktoren als Regulatoren der Transkription. Diese Verwendung multipler Promotorregionen ist ein Kontrollmechanismus des humanen ER α Gens, um zu gewährleisten, dass die richtige Anzahl des ER α Proteins am richtigen Ort und zur richtigen Zeit vorhanden ist [Grandien et al., 1995; Keaveney et al., 1991; Piva et al., 1993]. Eine derartige Kontrolle der gewebespezifischen Expressionsmuster des ER α ist angesichts der vielfältigen Effekte seines Liganden unumgänglich.

Die Existenz alternativer Transkriptionsstartpunkte in der 5'-flankierenden Region des ER α Gens wurde 1991 von Keaveney et al. [Keaveney et al., 1991] nach der Analyse von Sequenzen eines genomischen Klons beschrieben. Hierbei wurden Übereinstimmungen mit dem Exon 1 der Maus und dem 5'-Ende der ER α cDNA der Ratte gefunden. Durch das Screening unterschiedlicher Gewebe wurden in den darauf folgenden Jahren weitere Exons in der 5'-untranslatierten Region gefunden.

Bis heute sind 9 Exons bekannt, die oberhalb der kodierenden Exons liegen. Für die Mehrzahl dieser Exons wurden multiple Transkriptionsstartpunkte identifiziert, deren Promotorregionen über Interaktionen mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren [Schoor et al., 2001; DeConinck et al., 1995; McPherson et al., 1997; Tang et al., 1997; Cohn et al., 1999; McPherson, Weigel, 1999; Tanimoto et al., 1999; Penolazzi et al., 2000] oder Autoregulation durch Östrogene [Griffin et al., 1998; Donaghue et al., 1999] gewebespezifisch reguliert werden. Die großen Distanzen zwischen den Promotoren sprechen außerdem für eine epigenetische Regulation durch Gen Silencing. Die Promotoren der untranslatierten Exons haben nur eine schwache transkriptionale Aktivität und unterscheiden sich in ihrem Reaktionsvermögen auf eine Vielzahl von Stimuli sowie der mRNA Stabilität ihrer Transkripte [Ayoubi, Van de Ven, 1996].

Im Allgemeinen unterscheiden sich die Transkripte der untranslatierten Exons nur am 5'-Ende. Sie entstehen durch alternatives Spleißen des jeweiligen Exons an Position +163 des Exons 1. Diese Spleißposition liegt 70 Nukleotide oberhalb des Translationstartpunktes, so dass die anschließende Translation bei allen Transkripten in der Expression eines 66-kDa ER α Proteins resultiert. Ausnahmen wurden in einigen Zelllinien (z.B. Osteoblasten) gefunden, in denen Varianten mit einem niedrigeren Molekulargewicht exprimiert wurden. Diese Varianten entstanden durch zellspezifisches Spleißen mit Überspringen einzelner Exons.

Die Translation der durch multiple Promotoren entstandenen mRNAs kann durch regulatorische Elemente in der 5'-UTR kontrolliert werden [Gray, Wickens, 1998]. Diese Elemente führen zu einer Reduktion der Translation.

In den bis jetzt untersuchten Geweben wurden unterschiedliche Expressionsmuster von ER α gefunden. Es variieren sowohl die Expressionsspiegel des ER α Proteins als auch die Nutzung der verschiedenen Promotoren. Während der Differenzierung einer Zelllinie oder bei einer malignen Entartung eines Gewebes kann sich das jeweilige Expressionsprofil ändern.

Im Epithel des Endometriums beispielsweise wurde hauptsächlich eine durch Nutzung des Exons C entstandene Isoform identifiziert. In den Ovarien hingegen fand man von Exons C und F ausgehende ER α mRNA Isoformen, während die Transkripte im Lebergewebe zum größten Teil E-Isoformen waren.

Im Vergleich mit normalem Brust- und Uterusgewebe wurde in Tumorzelllinien dieser Gewebe eine vermehrte Nutzung des Promotors A und eine verminderte Nutzung des Promotors B festgestellt [Gradien et al., 1995]. Einige Promotoren (A, B, C) werden in unterschiedlicher Quantität in der Mehrzahl der untersuchten Organe exprimiert. Diese Promotoren zeigen Übereinstimmungen mit den Promotoren anderer Spezies (A und B mit Promotoren des Huhns [Griffin et al., 1998; Nestor et al., 1994], C mit einem Nagetierpromotor [Keaveney et al., 1991] und A, B und C mit denen des Rindes [Szreder, Zwierzchowski, 2004]).

2 Fragestellung

Die Nutzung der untranslatierten Exons des ER α als alternative Transkriptionsstartpunkte wurde bisher hauptsächlich an einzelnen Zelllinien oder als vergleichende Studien an Zellen der reproduktiven Organe untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Expression der ER α mRNA in Osteoblasten, Chondrozyten, Neuroblastomzellen und mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Im Anschluss sollte die Nutzung der 8 untranslatierten Exons und des nicht unabhängigen Exons A in diesen Zelllinien überprüft werden. Derartige Untersuchungen geben Aufschluss über die Verteilung der Verwendung der einzelnen untranslatierten Exons in den verschiedenen Zelltypen und geben Hinweise auf eine mögliche zellspezifische Einflussnahme auf die Transkription des ER α .

Untersucht werden sollen außerdem die Expressionsspiegel des Östrogenrezeptors während der osteogenen, der adipogenen und der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.

Insbesondere sollen folgende Fragestellungen erhell werden:

- Wird der ER α in allen untersuchten Zelllinien exprimiert?
- Welche untranslatierten Exons werden in den untersuchten Zellen als Transkriptionsstartpunkte genutzt?
- Gibt es zellspezifische Expressionsmuster der mRNA-Isoformen bei den untersuchten Zellen mit hauptsächlichlicher Nutzung eines oder mehrerer untranslatierter Exons als alternative Promotorregion?
- Ändert sich der Expressionsspiegel des ER α während der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Produkt	Herkunft	Beschreibung
Agarose GTQ	Roth	
Aspartat-2-Phosphat	Sigma	
AutoSeq 6-50	Amersham	Reinigung des PCR-Produkts
Big Dye Terminator RR Mix	Perkin Elmer	
Blotting Papier	Hartenstein	
Borsäure	Merck	
Bromphenolblau	Sigma	
Calciumchlorid Dihydrat	Roth	
cDNA: Fastclone PCR-Ready cDNA	Spring	Human Adult Mammary Gland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck	
EDTA	Sigma	Ethylenediaminetetraacetic acid
Essigsäure	Merck	
Ethanol absolut	Merck	
Ethidiumbromid	Sigma	
DMEM/F12-Ham	Sigma	
FCS 10%	GibcoBRL	Aktivkohlebehandelt und gefil- tert
Glycerol	Merck	
Guanidinium-Thiocyanat	Sigma	
HPLC-H ₂ O	Roth	
Hybond-N	Amersham	Membran für Blot
Kaliumchlorid	Merck	
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	
Mercaptoethanol	Sigma	
MinElute Gel Extraktion Kit	Qiagen	

M-MLV Reverse Transcriptase, RNaseH Minus, Punktmutation	Promega	
Natriumacetat-Trihydrat	Roth	
Natriumcitrat Dihydrat	Roth	
Natriumchlorid	Merck	
Oligotex Suspension		
PCR Nukleotid Mix	Promega	
PCR Puffer 10x	Amersham	
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA Laboratories GmbH	10,000 Units/10mg/ml
Random Hexamer pd(N)6	Amersham	
Rneasy [®] Mini Kit	Qiagen	
Sarkosyl	Sigma	
SDS	AppliChem	
Taq DNA Polymerase, Cloned for PCR	Amersham	Rekombinante Taq-Polymerase
Trisbase	Merck	
Trypsin	PAA Laboratories GmbH	
Xylen-Cyanol	Sigma	

Hinweis: Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Hersteller

3.1.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

DNA loading buffer 10x:	für Agarosegele 30% Glycerol 0.1 M EDTA pH 8.0 1% SDS 0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylen-Cyanol
Ethidiumbromid:	1 g Ethidiumbromid in 100 ml Aqua dest. Als färbender Zusatz für Agarosegele 0.5 µg/ml
Natriumacetat (NaAc) 3 M:	49.22 g Natriumacetat (nicht hydriert)

	Ad 200 ml Aqua dest. Lösen pH mit Essigsäure einstellen pH 4.6 (für DNA-Fällung mit Ethanol)
PCR-Puffer 10x : (Amersham)	Tris-Chlorid 100 mM Kaliumchlorid 500 mM Magnesiumchlorid 15 mM Gelatine 1mg/ml
Phosphate buffered saline: (PBS-Puffer)	Natriumchlorid 0.14 M Kaliumchlorid 2.5 mM Dinatriumhydrogenphosphat 10mM Kaliumhydrogenphosphat 1.5 mM
SSC-Puffer 20x:	Natriumchlorid 3 M Natriumcitrat 0.3 M PH 7.4
TBE-Puffer 10x:	108 g Trisbase 55 g Borsäure 40 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0 ad 1000 ml aqua dest. Autoklavieren

3.1.3 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für PCR und Sequenzierungen eingesetzt (Position bezogen auf Abbildung 8):

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Position (Bp)
DNADOMsense	AATTCAGATAATCGACGCCAG	1815-1835
DNADOMantisense	GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC	2137-2159
Ex1sense2	TGCCAAGGAGACTCGCTA	1892-1909
E1sense1	AGGAAGGAGTAAGCACAAAG	274-293
E1sense2	CTCTTCACATTCTCCGGGAC	296-315

Fsense1	TTCTATAGCATAAGAAGACAG	214-234
Fsense2	GAGTGATAATCTTCTCTCAA	240-260
E2sense1	AGCCTCAAATATCTCCAAAATCT	66-88
E2sense2	AATTATATTCTGTAGCTACCAAAGAAG	111-137
T2sense1	GAGAGCCAGTGCAATCAACACGAA	541-564
T2sense2	GCTGGGTCTTATGGAGACATGTG	597-619
T1sense1	TCTTGCCGCGCCATGTAAG	393-413
T1sense2	AGGCCTTCCCAGCCATGTGGAAC	454-476
Dsense1	CACATTCAACGGAGGAGCCA	669-688
Dsense2	ATCAATCTTTACCCTTCTTC	690-709
Csense1	TCTCTCGGCCCTTACTTCT	777-796
Csense2	CAAGCCCATGGAACATTTCTG	798-818
Bsense1	CTGGCCGTGAACTCAGCCT	950-969
Bsense2	ATCCAGCAGCGACACAAGT	972-991
1Asense1	CTCGCGTGTCGGCGGGACAT	1227-1246
1Asense2	GCTGCGTCGCCTCTAACCTC	1248-1268
Ex1antisense	TTGGATCTGATGCAGTAGGGC	1394-1415
Ex2antisense	GCGTCGATTATCTGAATTTGG	1812-1832

Tabelle 2: Verwendete PCR-Primer, Sequenzen und Basenpaarposition bezogen auf Abbildung 8

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien

Die Versuche wurden mit den Zelllinien hFOB 1.19 (humane fötale Osteoblasten), C28I₂ (Chondrozyten), SK-N-SH (Neuroblastomzellen) und MSC (primäre mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks) durchgeführt.

Bei den hFOB 1.19 handelt es sich um humane fötale osteoblastäre Zellen, die durch Transfektion mit dem Gen einer temperatursensitiven Mutante des large-T-Antigens des

Simian Virus (SV)-40 konditionell immortalisiert wurden. Die Aktivität des T-Antigens und damit die erhöhte Proliferationsrate der Zellen ist an eine Kultur bei 33.5°C gebunden. Die hFOB 1.19 sind zusätzlich gegen Neomycin (G418) resistent.

Die C28I₂ entstanden durch Transfektion humaner juveniler kostaler Chondrozyten mit dem Gen des large-T-Antigens des SV 40. Die auf diese Weise immortalisierten Chondrozyten zeigten erhöhte Proliferationsraten und eine verminderte Expression von Matrixproteinen.

Die SK-N-SH sind Neuroblastomzellen humaner Herkunft. Sie zeigen einen neuronalen Phänotyp und exprimieren sowohl Östrogenrezeptor mRNA als auch Nervenwachstumsfaktoren (nerve growth factor).

3.2.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in 75cm² Kulturflaschen mit DMEM/F12-Ham Medium unter Zugabe von 10% fötalem Rinderserum und Penicillin-Streptomycin kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Es wurde mit Aktivkohle behandeltes und phenolrotfreies Medium verwendet, um Östrogene und lipophile Verunreinigungen zu entfernen und eine Phenolbindung an ER α zu unterbinden. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 34°C und 5% CO₂. Unter diesen Bedingungen proliferierten die Zellen bis zur Konfluenz. Chondrozyten, mesenchymale Stammzellen und Neuroblastomzellen wurden geerntet, während die hFOBs bis zum siebten Tag nach Konfluenz inkubiert wurden.

Die Kultivierung der Neuroblastomzellen erfolgte in DMEM/F12-Ham Medium, das mit Na₂CO₃, 10% gestripptem fötalem Rinderserum (FCS) und Penicillin-Streptomycin versetzt wurde. Der pH wurde auf 7.1-7.2 eingestellt.

Bei den mesenchymalen Stammzellen wurde dem DMEM/F12 Ham-Medium außer 10% FCS und Penicillin-Streptomycin, noch Ascorbat-II-Phosphat hinzugefügt.

3.2.3 Zellgewinnung und RNA-Isolierung von totaler RNA

Zur Zellgewinnung wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 20 ml sterilem, kaltem PBS gewaschen. Der nächste Schritt und die anschließende RNA-Isolierung wurden mit einem RNeasy Mini Kit (Quiagen) durchgeführt.

Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Denaturierung der Zellproteine mit Guanidini-umthiocyanat und β -Mercaptoethanol und der anschließenden Fällung aller Nukleinsäuren mit Ethanol.

Nach der Entfernung des PBS-Puffers, wurden 500 μ l RLT-Puffer zu den Zellen gegeben und diese nach 2 Minuten Einwirkzeit abgekratzt. Das Gemisch wurde nun bei -80°C eingefroren.

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut und ihnen eine ihrem Volumen entsprechende Menge Ethanol zugefügt. Von diesem Gemisch gab man wiederum 700 μ l auf eine im Kit enthaltene RNeasy Minispin (Reinigungssäule). Nach Zentrifugation für 15 Sekunden und 10000 U/min, wurde das 2 ml Tube mit enthaltender Flüssigkeit verworfen und die Säule auf ein neues 2 ml Tube gesetzt. Im nächsten Schritt wurden 500 μ l RPE-Puffer auf die Säule pipettiert, erneut für 2 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert und das Tube mit Inhalt entfernt. Jetzt wurde die Säule auf ein 1.5 ml Eppendorfcap[®] überführt und 35 μ l RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Zur Standardisierung wurden zunächst 50 μ l HPLC-Wasser gemessen, dann 5 μ l RNA mit 45 μ l HPLC-Wasser verdünnt und ebenfalls gemessen. Bei der Beurteilung der Extinktion wurde ausgenutzt, dass Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum in monochromatischem Deuteriumlicht bei 260 nm haben, Proteine hingegen bei 280 nm. Der OD 260/OD 280-Quotient ist ein Maß für die Reinheit der RNA-Probe, der Wert sollte zwischen 1.8 und 2 (OD 1 = 40 μ g/ml) liegen. Niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung durch Proteine.

3.2.4 cDNA-Synthese

Um eine vollständige Sequenz der untranslatierten Exons und wichtiger Anteile des Östrogenrezeptors zu erhalten, wurde mit Hilfe von Random Hexamer-Primern, die an mehreren Stellen der RNA binden und somit auch eine reverse Transkription des 5'-Endes ermöglichen, aus RNA eine komplementäre cDNA hergestellt. Es wurde eine Variante der Moloney Murine Leukemia Virus Reversen Transkriptase verwendet (MMLV RT), die an die freie 3'-OH-Gruppe eines an RNA gebundenen Primers bindet. Nach ihrer Bindung synthetisiert sie den Rest des cDNA-Stranges aus den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten.

Entsprechend des photometrisch ermittelten RNA-Gehalts wurden bis maximal 13 μl RNA mit 1 μl Random Hexamer-Primer vermischt und nach Bedarf mit RNA-freiem Wasser zu einer Endmenge von 14 μl aufgefüllt. Nach 10-minütigem Erhitzen bei 70°C, wurde das Gemisch 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend kurz anzentrifugiert.

Jetzt wurde ein aus 4 μl 5x Puffer, 1 μl dNTP-Mix und 1 μl Reverse Transkriptase bestehender Mastermix hinzugegeben. Die resultierenden 20 μl wurden 1 Stunde in einen auf 42°C erhitzten Heizblock gestellt und danach die Reverse Transkriptase bei 70°C innerhalb von 10 Minuten denaturiert.

Die 20 μl wurden mit HPLC-Wasser zu einer Gesamtmenge von 50 μl aufgefüllt.

Der Erfolg der cDNA-Synthese wurde durch eine standardisierte PCR mit EF1 α (Elongation Factor 1alpha, eine Komponente der Translationsmaschinerie) oder Aktin überprüft.

Programm für PCR-Maschine (EF1 α):

Denaturierung	94°C 3 min	5. goto 2. Zyklen: 26
Denaturierung	94°C 1 min	6. 72°C 5 min
Annealing	54°C 1 min	7. 12°C forever
Elongation	72°C 1 min	

3.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Versuchsvorbereitung für die PCR wurden ausschließlich Einmalmaterialien verwendet und stets mit Handschuhen gearbeitet.

Ein aus 30 μl bestehender Versuchsansatz für die PCR bestand aus 1 μl cDNA, 1 μl Sense-Primer (forward), 1 μl Antisense-Primer (reverse) und 27 μl Mastermix. Der Mastermix enthielt pro Probe jeweils 1 μl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3 μl 10x PCR-Puffer, 22,5 μl HPLC-Wasser und 0.5 μl Taq-Polymerase.

Anschließend wurde die PCR bei folgendem Programm für 45 Zyklen im Thermocycler durchgeführt.

1. Denaturierung	94°C 3min	5. Wiederholung	44x
2. Denaturierung	94°C 0.15min	6. 72°C	5min

3. Annealing (variabel) 48-55°C 1.5min 7. 12°C forever
4. Elongation 72°C 1min

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst 1% Agarosegel durch Mischung von 1 g Agarosepulver und 100 ml 0.5x TBE, anschließendes Aufkochen bis zur vollständigen Lösung der Agarosekristalle und Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid hergestellt. Das flüssige Agarosegel wurde daraufhin in eine Form gegossen, ein Kamm eingesetzt und das Gel 15 Minuten zur Erhärtung stengelassen. Während dieser Wartezeit wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt mit 1 µl 10x DNA Ladungspuffer versetzt. Nach den 15 Minuten wurde die Elektrophoresekammer mit 0.5x TBE gefüllt, der Kamm entfernt und das mit Ladungspuffer versetzte PCR-Produkt in die so entstandenen Gelaussparungen pipettiert. Zu beiden Seiten der PCR-Produkte wurde außerdem ein 100 Basenpaare-Marker aufgetragen.

Zur Auftrennung und Identifizierung der PCR-Produkte wurde nun durch einen Transformator Gleichstrom an die Kammer angelegt. Bei Verwendung von kleinen Kammern erfolgte die Elektrophorese für ca 20 Minuten bei 110 Volt, große Kammern benötigten ca 50 Minuten und 140 Volt.

Nach der Elektrophorese erfolgte die Begutachtung des Gels unter einen UV-Licht-Tisch bei 254 nm. Die durch das fluoreszierende Ethidiumbromid gekennzeichneten PCR-Produkte konnten auf diese Weise ab einer Menge von 2-4 ng mRNA sichtbar gemacht und mit den Molekulargewichtsstandards des verwendeten Markers verglichen werden. Anschließend wurde das Gel digital dokumentiert.

3.2.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Durch die Sequenzierung sollte die Nukleotidabfolge der mittels verschiedener Primerpaare entstandenen PCR-Produkte herausgefunden werden. Hierzu wurde die Dye-Terminator-Sequenzierung verwendet, bei der für die vier Basen jeweils verschiedene fluoreszierende Dideoxynukleotide als Terminatoren eingebaut werden.

Anschließend kann die Abfolge der fluoreszierenden Nukleotide im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) ermittelt werden.

Zunächst wurde eine Sequenz-PCR durchgeführt. Hierfür wurden 1 µl des in der PCR verwendeten antisense Primers mit 8 µl Big DyeTM Terminator Mix vermischt. Dieser besteht aus: A-Dye-Terminator mit dichloro[R6G], C-Dye-Terminator mit dichloro[ROX], G-Dye-Terminator mit [TAMRA], dATP, dCTP, dITP, dUTP, AmliTaq Polymerase, MgCl₂ und Tris-Puffer, pH 9.

Je nach Intensität der in der Gelelektrophorese ermittelten Bande wurde dem Gemisch bis maximal 11 µl PCR-Produkt hinzugefügt und bei Bedarf mit HPLC-H₂O auf eine Endmenge von 20 µl aufgefüllt.

Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| 1. Denaturierung 94°C 3 min | 5. Zyklen: 25 |
| 2. Denaturierung 94°C 0.5 min | 6. Elongation 72°C 5 min |
| 3. Annealing 50°C 1 min | 7. 12°C forever |
| 4. Extension 60°C 1 min | |

Nach der Sequenz-PCR wurde das entstandene Produkt für 3 Minuten bei 6000 U/Minute über eine Auto-Seq-Säule abzentrifugiert. Zum gereinigten PCR-Produkt wurden im nächsten Schritt 8.1 µl Natriumacetat (3M, pH 4.3), 60 µl HPLC-H₂O und 220 µl 100% Ethanol gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 5 Minuten auf Eis gestellt. Das Gemisch wurde daraufhin für 10 Minuten bei 13000 U/Minute zentrifugiert, der Überstand im Anschluss verworfen und das Pellet mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 U/Minute, wurde der Überstand wieder verworfen und das Cap auf einem Tuch ausgeklopft. Nun wurde für 10 Minuten in Vakuum getrocknet und das aufbereitete PCR-Produkt mit 25 µl Template Suppression Reagenz (TSR) gelöst. Nach 3-minütiger Denaturierung bei 94°C in einem Heizblock, wurden die Proben sofort auf Eis überführt und dann in den ABI PRISM 310 Genetic Analyzer gestellt. Hier wurde ihre Sequenz ermittelt.

3.2.8 Extraktion einzelner Banden aus dem Gel

Zunächst wurde wie in 3.2.6 beschrieben eine Gelelektrophorese des zu untersuchenden PCR-Produkts durchgeführt.

Die Gel-Elution wurde mit einem MinElute Gel Extraktion Kit durchgeführt. Nach Anweisungen des Herstellers wurde zunächst dem im Kit enthaltenen PE-Puffer 100% Ethanol zugefügt und ein Heizblock auf 50°C äquilibriert.

Nun wurde das fertige Gel auf den UV-Tisch gelegt und die Bande unter Sicht mit einer scharfen, sauberen Klinge ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein Eppendorfcap überführt und mit einer entsprechenden Menge Gelauf Lösungspuffer QG versetzt (3x Volumen des Gelstücks, hier: 300 µl). Jetzt wurde das Gelstück für 10 Minuten bei 50°C inkubiert, wobei Gel und Auflösungspuffer alle 3 Minuten gemischt wurden. Nach der Auflösung des Gels wurde die Mischung mit 100 µl Isopropanol versetzt und die gesamte Lösung anschließend auf eine in einem 2 ml Waschgefäß sitzende Zentrifugationssäule pipettiert. Um eine Bindung der DNA an die Säule zu gewährleisten, wurde im nächsten Schritt der Ansatz für 1 Minute bei 13.000 U/Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule wieder auf das 2 ml Waschgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde mit 500 µl QG-Puffer wiederholt. Zur Reinigung der Zentrifugationssäule wurde sie mit 750 µl PE-Puffer geladen und nochmals für 1 Minute bei 13.000 U/Minute zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde entfernt und die leere Säule wurde 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Jetzt wurde die Säule in ein neues 1.5 ml Eppendorfcap überführt und zur Lösung der DNA der basischen EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) auf das Zentrum der Membran gegeben. Nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 Minute zentrifugiert und das Eluat bei -20°C eingefroren.

3.2.9 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen

Die für die Differenzierung benötigten mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von Hüftköpfen nach totaler Hüftarthroplastie isoliert. Die experimentelle Nutzung des Patientenmaterials war vom lokalen Ethikkomitee der Universität Würzburg genehmigt und geschah mit Einverständnis der Patienten.

Nach der Isolierung wurden die gewonnenen Zellen mit DMEM/F12 Medium unter Zugabe von 10% fötalem bovinem Serum (FBS), Antibiotika (50 I.U. Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml) und 50 µg/ml Ascorbat (komplettes Medium) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bis zur Konfluenz bei 37°C in 5% CO₂. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.10 Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen

Nach Erreichen der Konfluenz sollten die pluripotenten mesenchymalen Stammzellen zur osteogenen Differenzierung angeregt werden. Zu diesem Zweck wurden sie für vier Wochen mit komplettem Medium, das mit 10 mM β-Glycerophosphat und 50 µg/ml Ascorbat versetzt war, kultiviert. Das Medium wurde während dieser vier Wochen zweitägig gewechselt.

Um die Differenzierung zu überprüfen, wurden RT-PCR Analysen der alkalischen Phosphatase, Osteopontin und Osteocalcin durchgeführt. Die Anwesenheit der alkalischen Phosphatase wurde zusätzlich durch eine Färbung nachgewiesen (Sigma, Taufkirchen, Kit No. 86).

Um die Expression des ERα während der verschiedenen Differenzierungsschritte untersuchen zu können, wurde zuerst vor Beginn der Differenzierung und dann während der Differenzierung wöchentlich eine RNA-Isolierung durchgeführt.

Im Anschluss an die Isolierung wurde eine cDNA synthetisiert und die Anwesenheit des ERα mit Hilfe einer nested PCR überprüft. Es wurde ein Versuch mit zwei Primerpaaren aus dem Bereich der DNA-Domäne durchgeführt und in einem zweiten Versuch Primerpaare aus Exons 2 und 3 verwendet. Diese dienten schon bei der Untersuchung der untranslatierten Exons als Positivkontrolle.

3.2.11 Adipogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen

Um eine adipogene Differenzierung zu initiieren wurden die multipotenten mesenchymalen Stammzellen in ein DMEM Medium mit 10% FBS, 1 µM Dexamethason, 0.5 mM Isobutylmethylxanthin, 1 µg/ml Insulin und 100µM Indomethacin gegeben. Das Medium wurde zwei Wochen lang alle zwei Tage gewechselt. Zur Überprüfung der adipogenen Differenzierung wurde eine RT-PCR Analyse der Lipoproteinlipase und des

Peroxisom proliferatoraktivierenden Rezeptors gamma 2 (PPAR γ 2) durchgeführt. Anschließend wurden Lipidtröpfchen mit Oil Red O angefärbt.

Auch in dieser Differenzierungsreihe wurde vor Beginn der Differenzierung, nach einer und nach zwei Wochen eine RNA-Isolierung durchgeführt. Nach der folgenden cDNA-Synthese wurde wiederum eine nested PCR mit zwei Primerpaaren aus der DNA-Domäne und mit zwei Primerpaaren aus Exons 1 und 2 zur Überprüfung der Ergebnisse verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von ER α in verschiedenen Zelllinien

Der ER α vermittelt wichtige physiologische Funktionen in einer Vielzahl von Geweben. Um seine Existenz in den verwendeten Zelltypen (MSC, Neuroblastomzellen, hFOB, Chondrozyten) nachzuweisen, wurde der erste Versuch mit Primern aus kodierenden Exons des ER α durchgeführt. Die beiden sense Primer liegen im Exon 2, der antisense Primer im Exon 3. Die Untersuchungen wurden zunächst an einer aus polyA RNA synthetisierten cDNA durchgeführt.

DNADOMforward	5'-AAT TCA GAT AAT CGA CGC CAG-3'
DNADOMreverse	5'-GTG TTT CAA CAT TCT CCC TCC TC-3'
Ex1sense2	5'-TGC CAA GGA GAC TCG CTA-3'

Tabelle 3: Sequenz der zum Nachweis des ER α verwendeten Primer

Bei diesem Versuch wurde eine nested PCR durchgeführt. Bei diesem Verfahren binden die Primer der zweiten PCR innerhalb der in der ersten PCR amplifizierten Sequenz. Es kommt zu einer Anhebung der Spezifität und der Nachweisgrenze um bis zu drei Zehnerpotenzen [120].

PCR	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing-Temperatur
1. PCR	DNADOMforward	DNADOMreverse	53°C
2. PCR	Ex1sense2	DNADOMreverse	50°C

Tabelle 4: Primerkombinationen zum Nachweis des ER α in den vier untersuchten Zelltypen. Primer der 2. PCR liegen innerhalb der in der 1. PCR amplifizierten Sequenz. Dieses Verfahren führt zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze.

Der in der PCR amplifizierte Ausschnitt des Östrogenrezeptors hat eine Größe von ca. 270 Basenpaaren. Bei der als Positivkontrolle dienenden Mamma-cDNA und der cDNA der mesenchymalen Stammzellen zeigte sich das spezifische Signal mit erwarteter Größe bereits in der Elektrophorese der ersten PCR (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach der zweiten PCR war die spezifische Bande dann auch bei den Neuroblastomzellen

schwach sichtbar und die Signale von Mamma und MSCs hatten an Intensität zugenommen. Die anschließend durchgeführte Sequenzierung bestätigte die Identität der PCR Produkte.

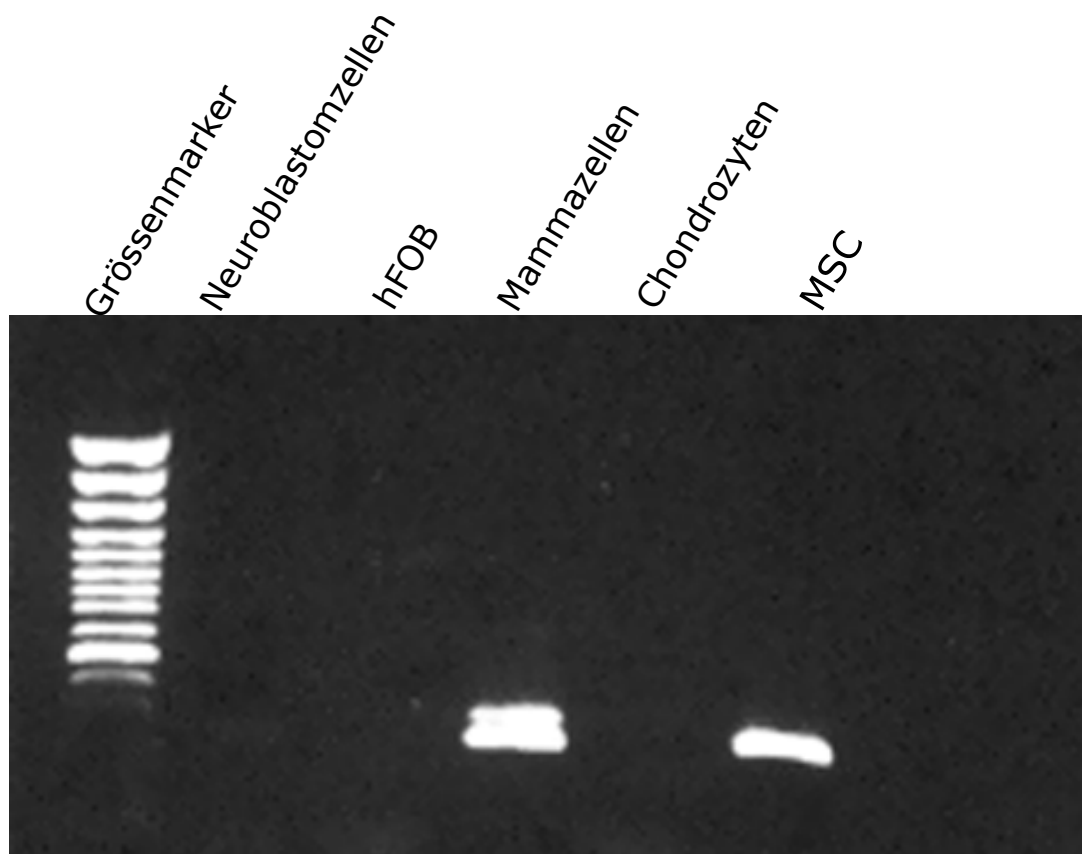


Abbildung 5: Nachweis des Östrogenrezeptors durch Amplifikation der DNA-Domäne. Mit zwei in der DNA-Domäne liegenden Primerpaaren wurde eine nested PCR durchgeführt. So wurde die Anwesenheit des Östrogenrezeptors bei Neuroblastomzellen, hFOBs, Mammazellen (Positivkontrolle), Chondrozyten und MSCs überprüft. Die Abbildung zeigt die zweite PCR. Bei den Mammazellen ist eine Doppelbande sichtbar.

Um diese Versuchsergebnisse zu überprüfen, wurden die Untersuchungen mit zwei neuen, aus totaler RNA gewonnenen cDNAs wiederholt. In dieser Versuchsreihe konnte der ER α bei neuronalen Zellen, Mammazellen und MSCs nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der untranslatierten Exons wurden aus diesem Grund an diesen cDNAs durchgeführt.

Die Existenz des ER α konnte mit der oben beschriebenen Versuchsanordnung bei Chondrozyten und hFOBs nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde bei diesen Zellen eine zweite Versuchsreihe als Positivkontrolle durchgeführt, bei der die sense Primer Exon 1A und die antisense Primer Exons 1 und 2 zuzuordnen sind. Hierbei konnte die Existenz des ER α auch in diesen beiden Zelltypen belegt werden.

Primer	Sequenz 5'-3'
1Asense1	CTCGCGTGTCGGCGGGACAT
1Asense2	GCTGCGTCGCCTCTAACCTC
Ex2antisense	CCAAATTCAGATAATCGACGCCAG
Ex1antisense	GCCCTACTGCATCAGATCCAA

Tabelle 5: Sequenz der zum Nachweis des ER α bei hFOBs und Chondrozyten verwendeten Primer

PCR	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing-Temperatur
1. PCR	1Asense1	Ex2antisense	50°C
2. PCR	1Asense2	Ex1antisense	55°C

Tabelle 6: Primerkombinationen zum Nachweis des ER α bei hFOBs und Chondrozyten.

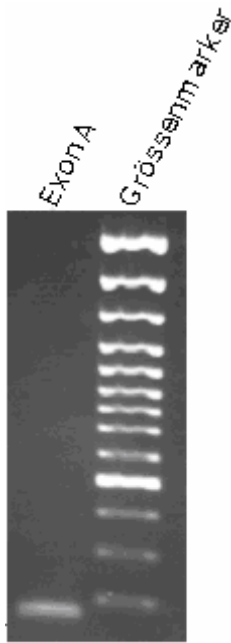


Abbildung 6: Nachweis des ER α bei hFOBs.
Zum Nachweis wurden sense Primer aus Exon 1A und antisense Primer aus Exons 1 und 2 verwendet.

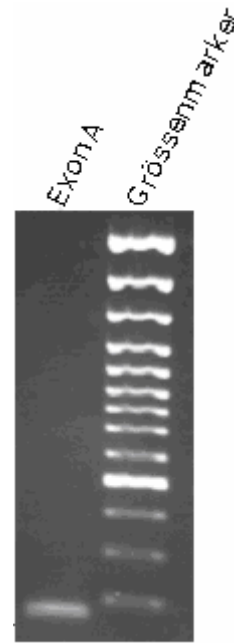


Abbildung 7: Nachweis des ER α bei Chondrozyten
Zum Nachweis wurden sense Primer aus Exon 1A und antisense Primer aus Exons 1 und 2 verwendet

4.2 Die Nutzung der untranslatierten Exons durch verschiedene Zelltypen

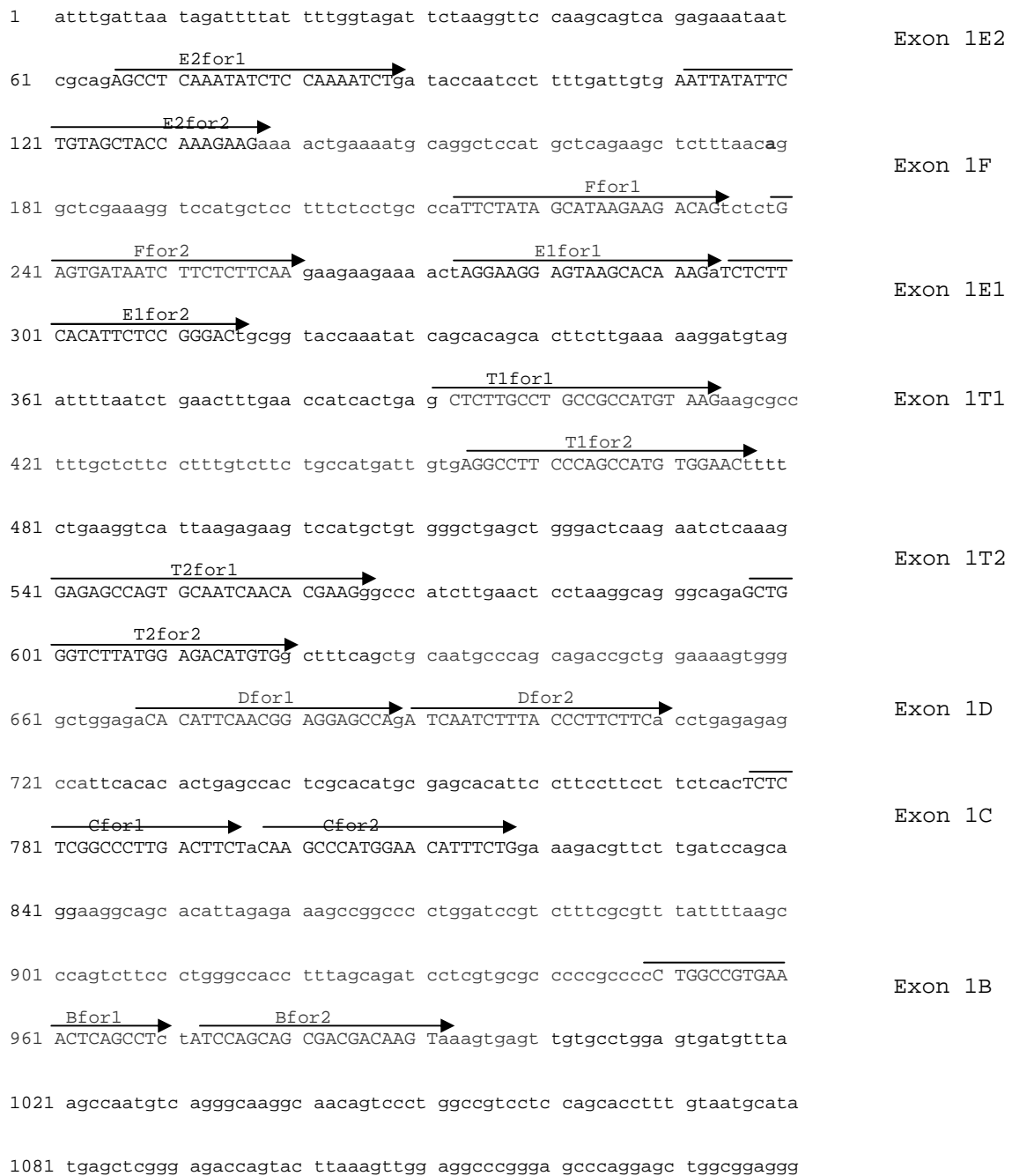
In den im Folgenden dargestellten Versuchsreihen sollte die Nutzung der acht untranslatierten Exons und des Exons A in den verschiedenen Zelltypen überprüft werden.

Zur Erhöhung der Spezifität wurde für jedes untranslatierte Exon eine nested PCR durchgeführt. Hierfür wurden zwei PCRs mit unterschiedlichen Primerpaaren hintereinander durchgeführt (Sequenz der verwendeten Primer in Tabellen 7 und 8, Primerkombination in den PCRs Tabelle 9). Um die resultierenden Ergebnisse zu überprüfen wurde die Versuchsreihe mit einer zweiten cDNA wiederholt. Dabei lagen beide sense Primer im jeweiligen untranslatierten Exon in Kombination mit antisense Primern aus Exons 1 und 2. Zur Vereinfachung werden im Folgenden die PCR Produkte, die der Nutzung eines bestimmten untranslatierten Exons zuzuordnen sind als Exon A, B, C usw. bezeichnet.

Die Produkte der zweiten PCR wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 10, 12, 14, 16) und ihre Größe anhand der Molekulargewichtsstandards des verwendeten 100 Basenpaarmarkers beurteilt. Zur Überprüfung der PCR-Ergebnisse wurden schließlich noch Sequenzierungen durchgeführt.

In den Abschnitten 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 und 4.2.4 sind die Versuchsergebnisse bei den Chondrozyten, den mesenchymalen Stammzellen, den hFOB Zellen und den neuronalen Zellen dargestellt.

Abbildung 8: Sequenz des ER α und Lage der verwendeten Primer zum Nachweis des ER α , der acht untranslatierten Exons und des Exons A.



Primer PCR 1	Sequenz 5'-3'
E1sense1	AGGAAGGAGTAAGCACAAAG
Fsense1	TTCTATAGCATAAGAAGACAG
E2sense1	AGCCTCAAATATCTCCAAAATCT
T1sense1	GAGAGCCAGTGCAACAACACGAAG
T2sense1	TCTTGCCTGCCGCCATGTAAG
Dsense1	CACATTCAACGGAGGAGCCA
Csense1	TCTCTCGGCCCTTGACTTCT
Bsense1	CTGGCCGTGAAACTCAGCCT
IAsense1	CTCGCGTGTCTGGCGGGACAT
Ex2antisense	CCAAATTCAGATAATCGACGCCAG

Primer PCR 2	Sequenz 5'-3'
E1sense2	CTCTTCACATTCTCCGGGAC
Fsense2	GAGTGATAATCTTCTCTTCAA
E2sense2	AATTATATTCTGTAGCTACCAAGAAG
T1sense2	GCTGGGTCTTATGGAGACATGTG
T2sense2	AGGCCTTCCCAGCCATGTGGAAC
Dsense2	ATCAATCTTTACCCTTCTTC
Csense2	CAAGCCCATGGAACATTTCTG
Bsense2	ATCCAGCAGCGACGACAAGT
IAsense2	GCTGCGTCTGCCTCTAACCTC
Ex1antisense	GCCCTACTGCATCAGATCCAA

Tabelle 7 und 8: Sequenzen der zur Untersuchung der untranslatierten Region des ER α verwendeten Primer

Exon	Primer PCR 1	Primer PCR 2	Produktlänge nested PCR in Bp
E1	E1sense1-Ex2antisense	E1sense2-Ex1antisense	224
F	Fsense1-Ex2antisense	Fsense2-Ex1antisense	289
E2	E2sense1-Ex2antisense	E2sense2-Ex1antisense	negativ
T1	T1sense1-Ex2antisense	T1sense2-Ex1antisense	negativ
T2	T2sense1-Ex2antisense	T2sense2-Ex1antisense	157

D	Dsense1-Ex2antisense	Dsense2-Ex1antisense	negativ
C	Csense1-Ex2antisense	Csense2-Ex1antisense	172
B	Bsense1-Ex2antisense	Bsense2-Ex1antisense	145
1A	1Asense1-Ex2antisense	1Asense2-Ex1antisense	167

Tabelle 9: Primerkombinationen zur Untersuchung der untranslatierten Region des ER α

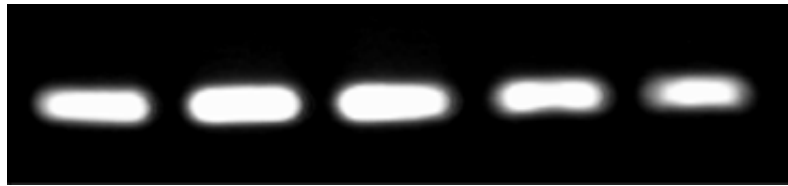


Abbildung 9: Überprüfung der verwendeten cDNAs. Nach der Synthese wurde die Effektivität der cDNA Herstellung durch eine PCR mit EF1 α kontrolliert. Die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese zeigt bei allen cDNAs Banden in erwarteter Größe.

4.2.1 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei Chondrozyten

Um die Nutzung der 8 untranslatierten Exons und des Exons A bei den Chondrozyten nachzuweisen, wurden für jedes Exon eine nested PCR mit zwei hintereinander geschalteten PCR-Reaktionen an zwei unterschiedlichen, aus totaler RNA gewonnenen cDNAs durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung zeigten Exons F, T2, C und A Banden in den erwarteten Größen von ca. 290 bp, 160 bp, 170 bp und 170 bp. Die PCR für Exons E1 und T1 trennten sich in mehrere Banden unterschiedlicher Größe auf, die sich erst nach Sequenzierung beurteilen ließen. Ebenso zeigte Exon B in der ersten Versuchsreihe eine nur schwach sichtbare Doppelbande bei 160 bp und 140 bp. In der zweiten Versuchsreihe waren wiederum Mehrfachbanden sichtbar. Die ausgeprägtesten Banden lagen im Gegensatz zum ersten Versuch bei 500 bp und 200 bp. Kontrollversuche mit zwei neuen cDNAs bestätigte die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe.

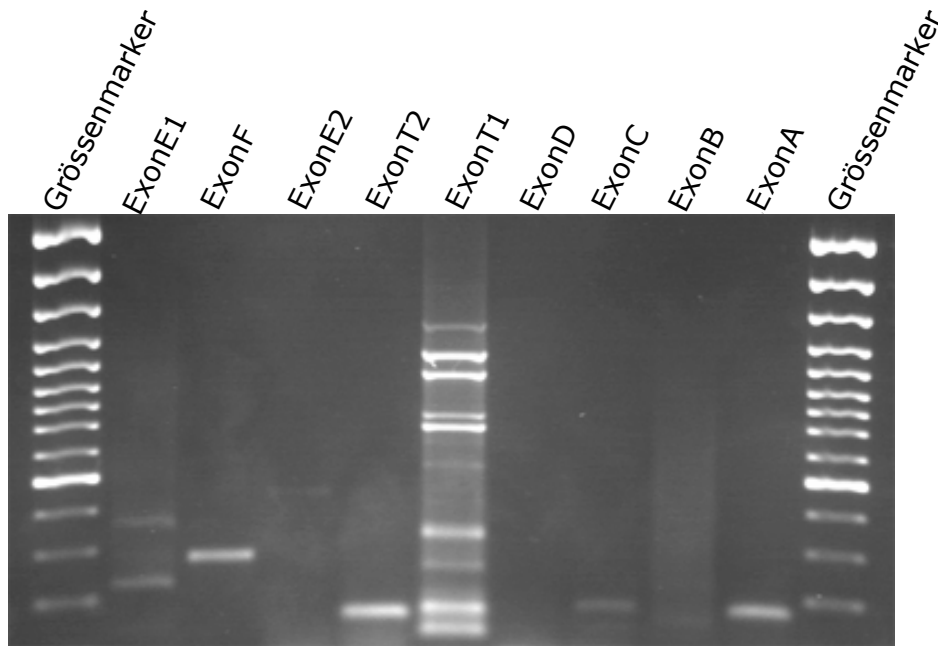


Abbildung 10: Untersuchung der untranslatierten Exons bei Chondrozyten. Wie in Tabelle 9 dargestellt, wurde für jedes untranslatierte Exon eine nested PCR durchgeführt. Hier werden die Ergebnisse der zweiten PCR gezeigt. Die Darstellung setzt sich aus zwei mit unterschiedlichen cDNAs durchgeführten Versuchsreihen zusammen.

4.2.1.1 Sequenzierung der PCR-Produkte der Chondrozyten

Nach der Auftrennung und Beurteilung durch Gelelektrophorese wurden alle PCR-Produkte zur Überprüfung der Ergebnisse sequenziert.

Hierbei konnten die zu den Exons F, E1, T2, C und B korrespondierenden PCR-Produkte als Startpunkte der Transkription nachgewiesen werden. (Tabelle 10). Die Sequenzierungen zeigten folgende Übereinstimmungen mit publizierten Sequenzen von ER α :

Exon F: mit Genbank Einträgen U68068, AJ002562

Exon E1: mit Genbank Einträgen U68068, X86816

Exon T2: mit Genbank Einträgen AY425004, NM_000125

Exon C: mit Genbank Einträgen HSERG5UTA, AY425004

Exon B: mit Genbank Einträgen AY425004, AL356311

Exon A: mit Genbank Einträgen AY425004, NM 000125

Die Sequenzierungen zeigten, dass Exons E1, T2 und C durch alternatives Spleißen direkt an die Akzeptorspleißseite an Position +163 in Exon 1 (hier Position 1289, siehe Abbildung 8) gebunden werden. Alle dazwischen liegenden untranslatierten Exons wurden übersprungen. Eine Variante zeigte Exon F, bei dem außerdem noch Exon E1 vor Exon 1 gespleißt wurde. Die Bedeutung der bei Exon B aufgetretenen Mehrfachbanden wurde durch Sequenzierungen sowohl mit dem sense als auch mit antisense Primer untersucht. Exon B blieb in der ersten Versuchsreihe negativ (Bild oben). In der zweiten Versuchsreihe erwies sich die größere Bande mit ca. 500 bp als positiv. Grund für das große Produkt war ein kontinuierliches Transkript von Exon B bis zum antisense Primer in Exon 1. Es fand kein alternativer Spleißvorgang statt. Dieses Ergebnis wurde durch Versuche mit zwei weiteren cDNAs bestätigt.

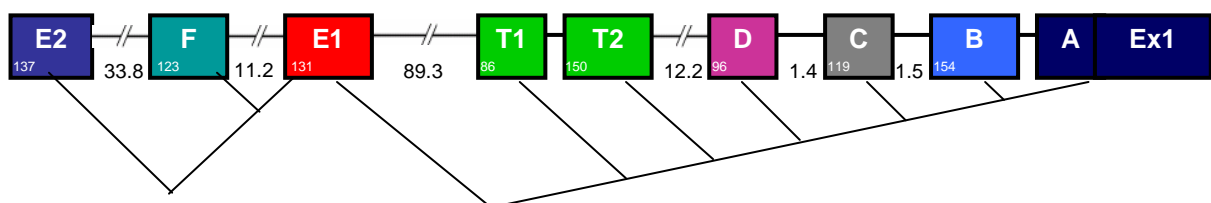
Da die Sequenzierung der bei Exon T1 aufgetretenen Mehrfachbanden kein verwendbares Ergebnis zeigte, wurde eine Gelelution mit Ausschneiden der Banden durchgeführt. Die einzelnen Banden wurden wiederum sequenziert. Alle Resultate dieser Sequenzierung waren negativ.

Tabelle 10: Nachgewiesene untranslatierte Exons bei den Chondrozyten

Ex1E2	Ex1F	Ex1E1	Ex1T1	Ex1T2	Ex1D	Ex1C	Ex1B	ExA
-	+	+	-	+	-	+	+	+

Legende zu Tabelle 10: Durch zwei unabhängige RNAs bestätigte positive und negative untranslatierte Exons bei den Chondrozyten. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bei Exon B wurden zwei weitere unabhängige cDNAs untersucht, die beide eine Nutzung von Exon B als Transkriptionsstartpunkt nachwiesen. In der nun folgenden Abbildung 11b sind die positiv nachgewiesenen Exons graphisch dargestellt

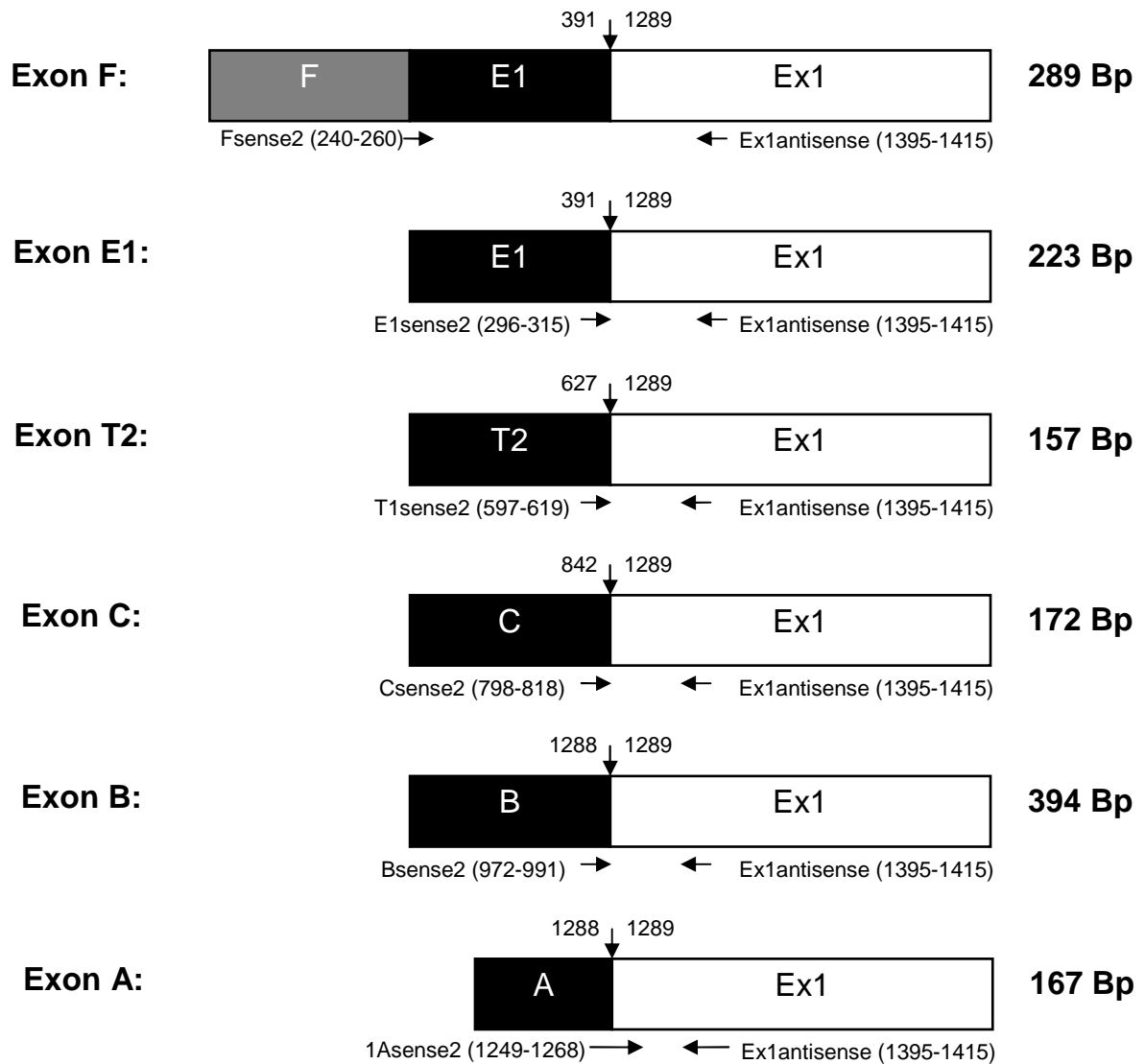
Abbildung 11a: Die genomische Organisation der Promotorregion des humanen ER α Gens



Legende zu Abbildung 11a: Die Abbildung zeigt die bis zum heutigen Tag beschriebenen untranslatierten Exons des ER α Gens in der von Kos et al. vorgeschlagenen Reihenfolge. Die bunten Vierecke repräsentieren

tieren die untranslatierten Exons, die Zahlen in den Vierecken entsprechen der Größe des jeweiligen Exons in Basenpaaren. Die Zahlen zwischen den Exons korrespondieren mit der Größe der Introns in Kilobasenpaaren. Die Linien unterhalb der Exons stellen die Spleißvarianten dar.

Abbildung 11b: Nachgewiesene mRNA-Varianten bei den Chondrozyten



Legende zu Abbildung 11b: Die Abbildungen stellen die bei den Chondrozyten nachgewiesenen mRNA-Varianten dar. Der senkrecht nach unten zeigende Pfeil markiert den Übergang vom untranslatierten Exon zum Exon 1. Die Zahl links des senkrechten Pfeils gibt die Position des letzten Basenpaares des untranslatierten Exons im ER α Gen an, die Zahl rechts des senkrechten Pfeils die Position des ersten Basenpaares des Exon 1 im ER α Gen an.

res des Exons 1 im ER α Gen. Unterhalb jeder mRNA-Variante sind die jeweils für die 2. PCR verwendeten Primer mit ihrer Position im ER α Gen angegeben.

Die Zahl rechts von der Abbildung gibt die Größe der mRNA-Variante in der Sequenzierung (das heißt zwischen den beiden Primern der 2. PCR) in Basenpaaren an.

4.2.2 Nutzung der untranslatierten Exons bei mesenchymalen Stammzellen

Die Nutzung der 8 untranslatierten Exons und des nicht unabhängigen Exons A als Startpunkte der Transkription wurde bei den MSCs durch nested PCR-Reaktionen mit sense Primern aus dem jeweiligen untranslatierten Exon und antisense Primern aus den Exons 2 und 3 untersucht. Die Versuche wurden an zwei unterschiedlichen, aus totaler RNA gewonnenen cDNAs durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei ergaben sich Ergebnisse in erwarteter Größe korrespondierend zu den untranslatierten Exons F, T2, C, B und Exon A. Diese lagen bei 290 bp, 160 bp, 170 bp, 150 bp und 170 bp. Die bei Exon E1 und Exon T1 aufgetretenen Mehrfachbanden wurden durch Sequenzierung bzw. Gelextraktion untersucht.

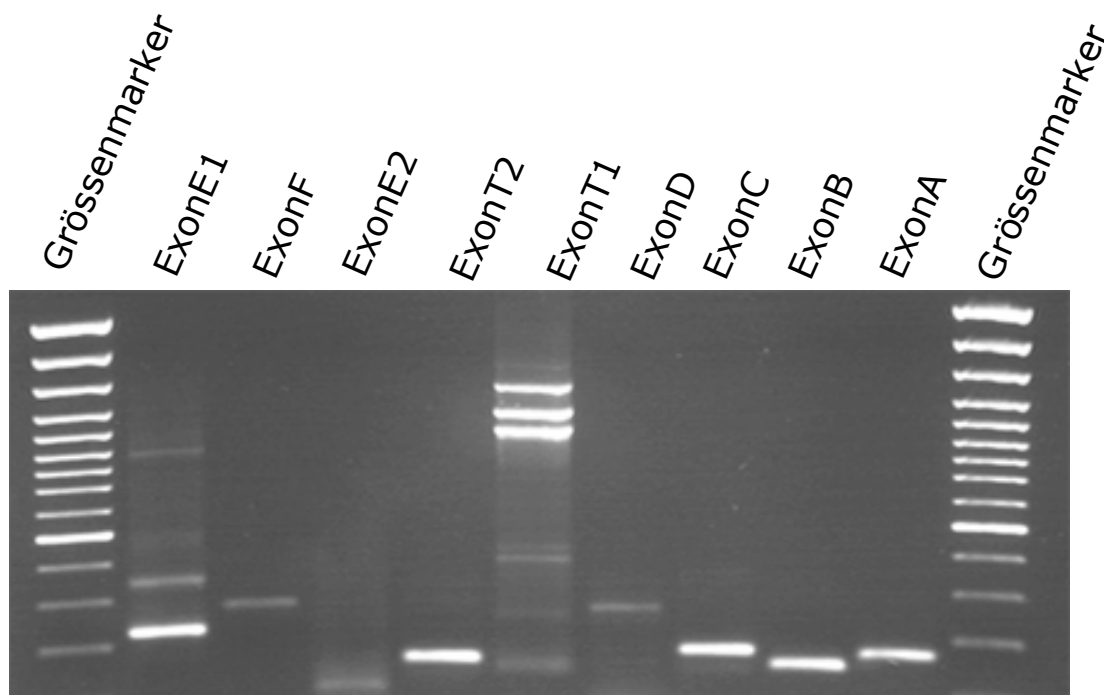


Abbildung 12: Untersuchung der untranslatierten Exons. Wie in Tabelle 9 dargestellt, wurde für jedes untranslatierte Exon eine nested PCR durchgeführt. Hier werden die Ergebnisse der zweiten PCR gezeigt. Die Darstellung setzt sich aus zwei mit unterschiedlichen cDNAs durchgeführten Versuchsreihen zusammen.

4.2.2.1 Sequenzierung der PCR-Produkte der MSCs

Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte bei den mesenchymalen Stammzellen die Identität der Produkte bei den untranslatierten Exons F, E1, T2, C und B und A in beiden Versuchsreihen. Mit den Sequenzierungen ergaben sich folgende Übereinstimmungen mit publizierten Sequenzen des ER α :

Exon F: mit Genbank Einträgen U68068, AJ002562

Exon E1: mit Genbank Einträgen U68068, AJ002562

Exon T2: mit Genbank Einträgen AY425004, NM_000125

Exon C: mit Genbank Einträgen HSERG5UTA, AY425004

Exon B: mit Genbank Einträgen AJ002559, AY425004

Exon A: mit Genbank Einträgen AY425004, NM_000125

Die Sequenzierungen zeigten, dass Exons T2, C und B direkt an Position +163 in Exon 1 (hier Position 1289, siehe Abbildung 8) gespleißt wurden. Bei Exon F wurde zusätzlich das komplette Exon E1 vor Exon 1 gespleißt. Die Sequenzen von Exon E1 unterschieden sich bei den beiden Versuchsreihen in ihrer Länge. Eine Sequenz hatte eine Länge von 220 bp, die andere eine Länge von 140 bp (siehe Gelelektrophorese). Das größere Produkt setzte sich aus Exon E1 sowie der Akzeptorspleißseite an Position +163 und darauf folgenden Teilen von Exon 1 zusammen. Produkte dieser Größe wurden auch in den anderen untersuchten Zelllinien gefunden. Das kleinere Produkt beinhaltete nur den verwendeten forward Primer und bis auf sieben Nukleotide das gesamte Exon E1.

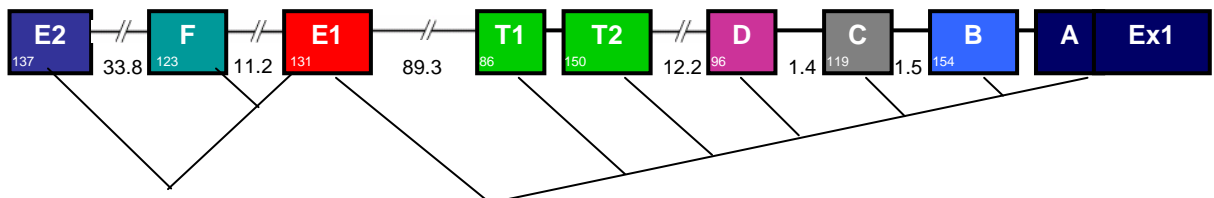
Die bei Exon T1 aufgetretenen Mehrfachbanden wurden aus dem Gel extrahiert und einzeln sequenziert. Die Ergebnisse dieser Sequenzierungen deuteten auf unspezifische PCR-Produkte hin.

Tabelle 11: Nachgewiesene untranslatierte Exons bei den MSCs

Ex1E2	Ex1F	Ex1E1	Ex1T1	Ex1T2	Ex1D	Ex1C	Ex1B	ExA
-	+	+	-	+	-	+	+	+

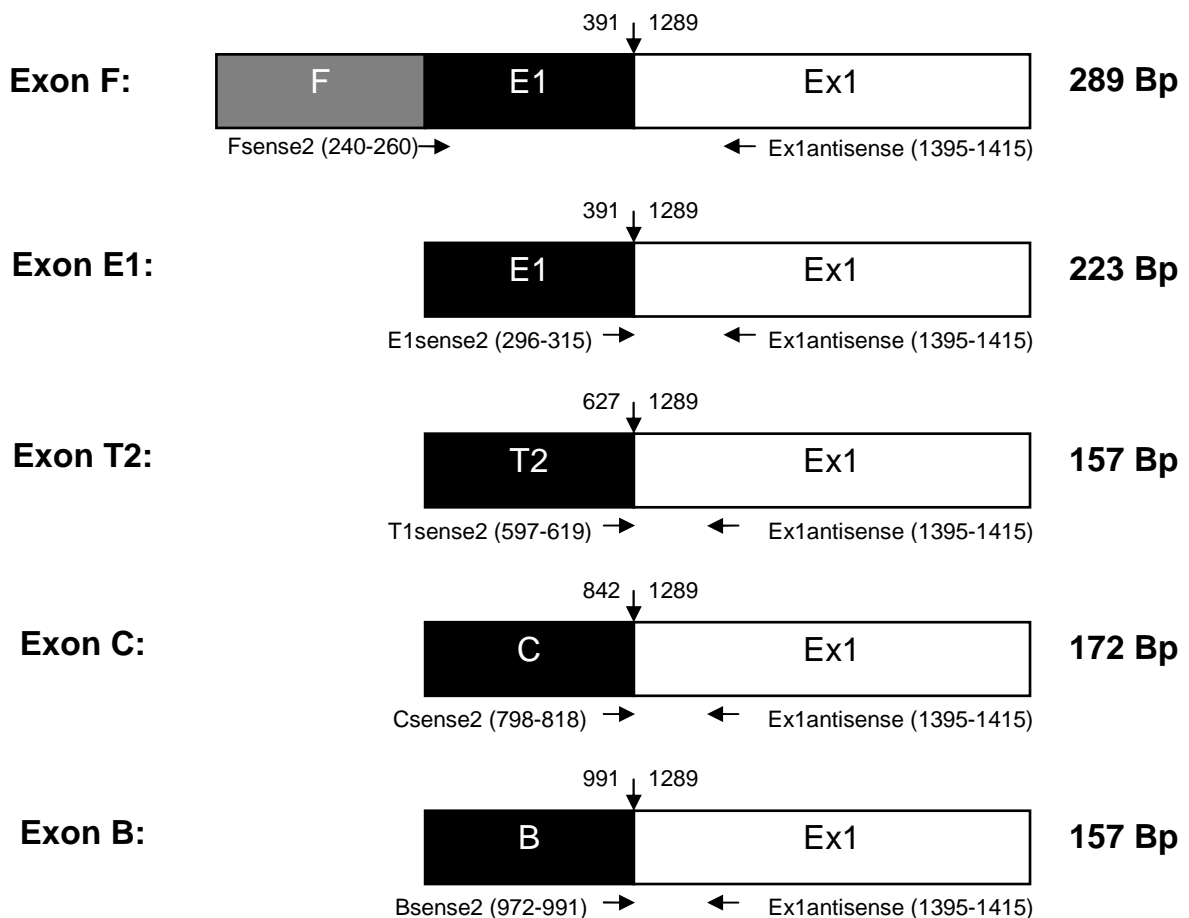
Legende zu Tabelle 11: Durch Verwendung von zwei unabhängigen cDNAs überprüfte positive und negative Ergebnisse der Nutzung der untranslatierten Exons als Transkriptionsstartpunkte. Zur Herstellung der cDNAs wurde totale RNA verwendet. Eine graphische Darstellung der bei den MSCs positiv nachgewiesenen untranslatierten Exons folgt in Abbildung 13b.

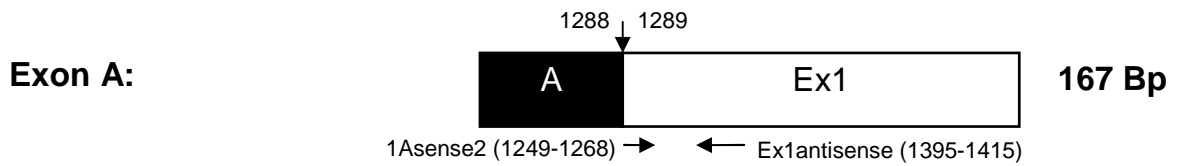
Abbildung 13a: Die genomische Organisation der Promotorregion des humanen ER α Gens



Legende zu Abbildung 13a: Die Abbildung zeigt die bis zum heutigen Tag beschriebenen untranslatierten Exons des ER α Gens in der von Kos et al. vorgeschlagenen Reihenfolge. Die bunten Vierecke repräsentieren die untranslatierten Exons, die Zahlen in den Vierecken entsprechen der Größe des jeweiligen Exons in Basenpaaren. Die Zahlen zwischen den Exons korrespondieren mit der Größe der Introns in Kilobasenpaaren. Die Linien unterhalb der Exons stellen die Spleißvarianten dar.

Abbildung 13b: Nachgewiesene mRNA-Varianten bei MSCs





Legende zu Abbildung 13b: Die Abbildungen darunter stellen die bei den mesenchymalen Stammzellen nachgewiesenen mRNA-Varianten dar. Der senkrecht nach unten zeigende Pfeil markiert den Übergang vom untranslatierten Exon zum Exon 1. Die Zahl links des senkrechten Pfeils gibt die Position des letzten Basenpaares des untranslatierten Exons im ER α Gen an, die Zahl rechts des senkrechten Pfeils die Position des ersten Basenpaares des Exons 1 im ER α Gen. Unterhalb jeder mRNA-Variante sind die jeweils für die 2. PCR verwendeten Primer mit ihrer Position im ER α Gen angegeben.

Die Zahl rechts von der Abbildung gibt die Größe der mRNA-Variante in der Sequenzierung (das heißt nur zwischen den Primern der 2. PCR) in Basenpaaren an.

4.2.3 Die Nutzung untranslatierter Exons bei hFOB Zellen

Um die Nutzung der 8 untranslatierten Exons und des nicht unabhängigen Exons A als alternative Transkriptionsstartpunkte bei den hFOB Zellen zu untersuchen, wurden nested PCR-Reaktionen mit sense Primern aus dem jeweiligen untranslatierten Exon und antisense Primern aus Exons 1 und 2 verwendet. Diese Versuche wurden an zwei unterschiedlichen, aus totaler RNA gewonnenen cDNAs durchgeführt. Bei der anschließenden gelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte zeigten sich Banden in erwarteter Größe bei Exons C (170 bp) und A (170 bp). Die untranslatierten Exons E1, F und B hatten sich in mehrere Banden aufgetrennt, wobei besonders die prominente Bande in einer Größe von ca. 400 bp bei Exon B auffiel. Die Bedeutung dieser Mehrfachbanden wurde durch Sequenzierungen mit den sense und antisense Primern untersucht.

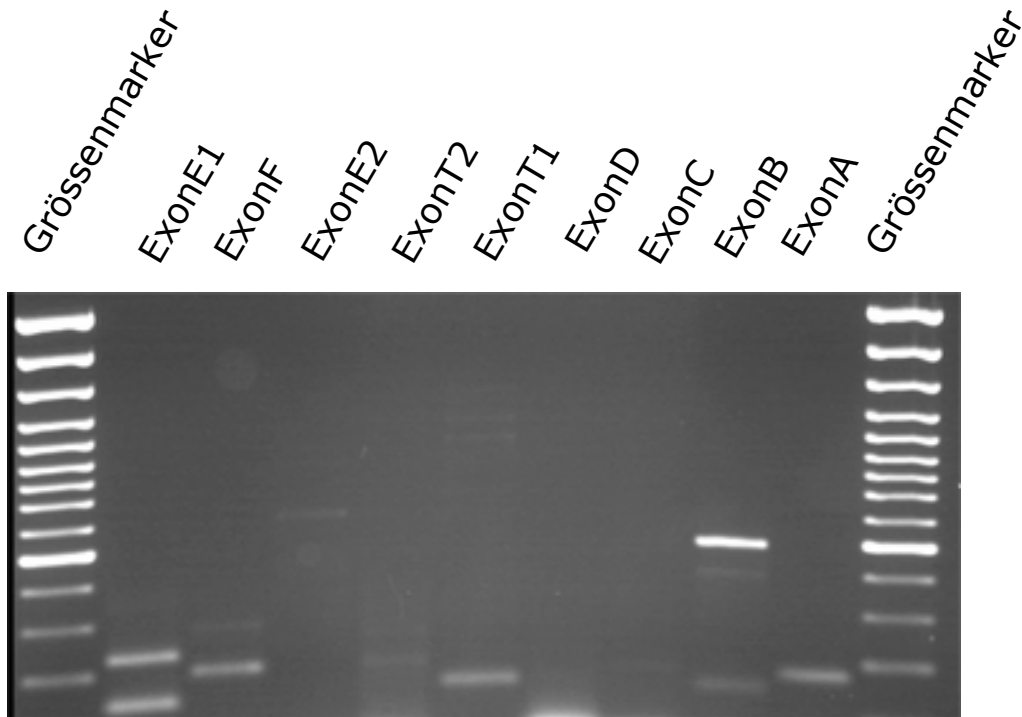


Abbildung 14: Untersuchung der untranslatierten Exons. Wie in Tabelle 9 dargestellt wurde für jedes untranslatierte Exon eine nested PCR durchgeführt. Hier werden die Ergebnisse der zweiten PCR gezeigt. Die Darstellung setzt sich aus zwei mit unterschiedlichen cDNAs durchgeführten Versuchsreihen zusammen.

4.2.3.1 Sequenzierung der PCR-Produkte der hFOB Zellen

Die Sequenzierungen ergaben bei den hFOB Zellen positive Ergebnisse bei Exons F, E1, C und B und A. Es ergaben sich folgende Übereinstimmungen mit publizierten Sequenzen:

Exon F: mit Genbank Einträgen AL356311, U68068, AL035695

Exon E1: mit Genbank Einträgen AL035695, AB090237

Exon C: mit Genbank Einträgen HSERG5UTA, AY425004

Exon B: mit Genbank Einträgen AY425004, AL356311

Exon A: mit Genbank Einträgen AY425004, NM 000125

Exon T2 blieb bei beiden cDNAs negativ. Exon C wurde an die Akzeptorspleißseite in Exon 1 gebunden. Das Transkript von Exon B wurde nicht gespleißt und beinhaltete das gesamte Exon B sowie das Exon 1 bis zum verwendeten antisense Primer. Bei den E-

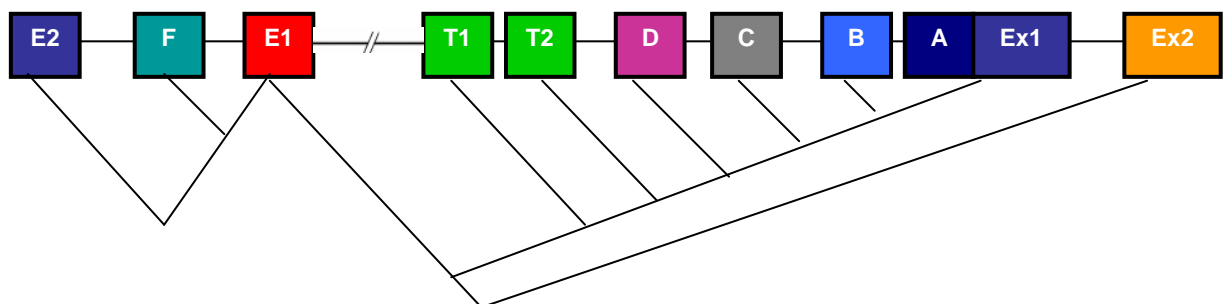
xons F und E1 traten zwei Produkte auf, wobei das größere bei Exon E1 aus 220 bp bestand und das kleinere eine Größe von 130 bp hatte. Bei Exon F wurden Produkte mit einer Größe von 290 bp und 180 bp sequenziert. Um die beiden kleineren Produkte besser beurteilen zu können, wurde jede Sequenzierung sowohl mit dem sense als auch mit dem antisense Primer durchgeführt. Die beiden größeren Produkte bestanden bei Exon E1 aus dem untranslatierten Exon selbst und Teilen von Exon 1 und bei Exon F aus Exon F, E1 und Teilen von Exon 1. Die kleineren Produkte stellten sich als Spleißvarianten heraus. In beiden Fällen wurden einmal Exon E1 und bei der Nutzung von Exon F als Startpunkt Exon F und Exon E1 an Exon 2 gespleißt. Exon 1 wurde bei diesen Varianten vollständig übersprungen. Die kürzeren Produkte kodieren somit für ein verkürztes ER α Protein. Diese Spleißvarianten zeigten sowohl bei Exon F als auch bei Exon E1 eine ausgeprägtere Bande in der Gelelektrophorese.

Tabelle 12: Nachgewiesene untranslatierte Exons bei hFOB Zellen

Ex1E2	Ex1F	Ex1E1	Ex1T1	Ex1T2	Ex1D	Ex1C	Ex1B	Ex1A
-	+	+	-	-	-	+	+	+

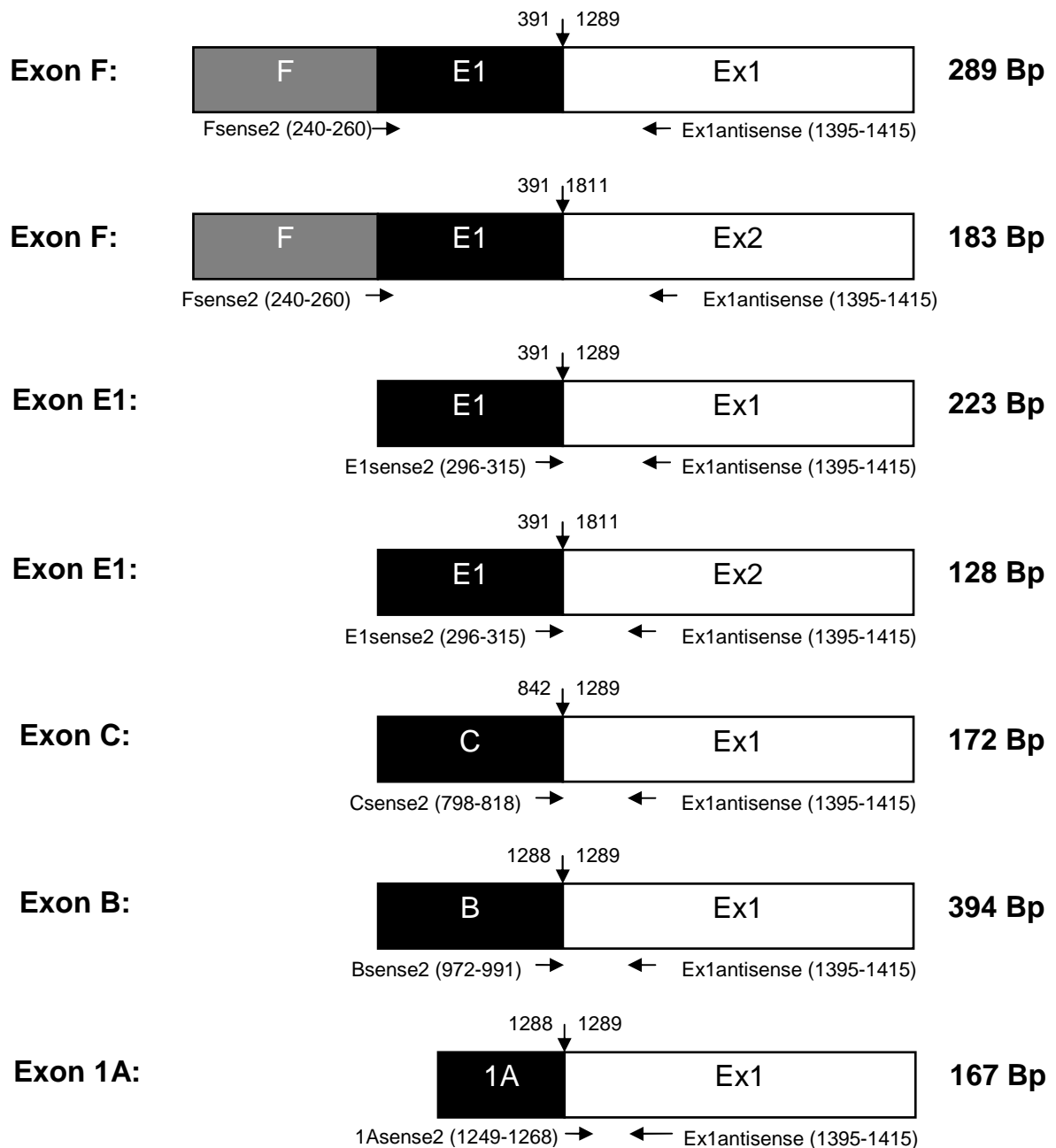
Legende zu Tabelle 12: Positive und negative untranslatierte Exons bei den hFOB Zellen. Die Ergebnisse wurden durch die Verwendung von zwei unabhängigen cDNAs bestätigt. Die cDNAs wurden aus totaler RNA hergestellt. Eine graphische Darstellung der bei den hFOB Zellen positiv nachgewiesenen untranslatierten Exons folgt in Abbildung 15b.

Abbildung 15a: Die genomische Organisation der Promotorregion des humanen ER α Gens



Legende zu Abbildung 15a: Die Abbildung zeigt die bis zum heutigen Tag beschriebenen untranslatierten Exons des ER α Gens in der von Kos et al. vorgeschlagenen Reihenfolge. Die bunten Vierecke repräsentieren die untranslatierten Exons, die Zahlen in den Vierecken entsprechen der Größe des jeweiligen Exons in Basenpaaren. Die Zahlen zwischen den Exons korrespondieren mit der Größe der Introns in Kilobasenpaaren. Die Linien unterhalb der Exons stellen die Spleißvarianten dar.

Abbildung 15b: Nachgewiesene mRNA-Varianten bei den hFOB Zellen



Legende zu Abbildung 15b: Die Abbildungen darunter stellen die bei den hFOB Zellen nachgewiesenen mRNA-Varianten dar. Der senkrecht nach unten zeigende Pfeil markiert den Übergang vom untranslatierten Exon zum Exon 1 oder Exon 2. Die Zahl links des senkrechten Pfeils gibt die Position des letzten Basenpaares des untranslatierten Exons im ER α Gen an, die Zahl rechts des senkrechten Pfeils die Position des ersten Basenpaares des Exons 1 oder Exons 2 im ER α Gen. Unterhalb jeder mRNA-Variante sind die jeweils für die 2. PCR verwendeten Primer mit ihrer Position im ER α Gen angegeben.

Die Zahl rechts von der Abbildung gibt die Größe der mRNA-Variante in der Sequenzierung (das heißt zwischen den beiden Primern der 2. PCR) in Basenpaaren an.

4.2.4 Die Nutzung untranslatierter Exons bei neuronalen Zellen

Um die Nutzung der 8 untranslatierten Exons und des Exons A bei neuronalen Zellen nachzuweisen, wurden für jedes Exon nested PCR-Reaktionen mit zwei hintereinander geschalteten PCRs an zwei unterschiedlichen, aus totaler RNA gewonnenen und einer aus mRNA gewonnenen cDNAs durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Ergebnisse elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung zeigten T2 und B PCR-Produkte in den erwarteten Größen von 160 bp und 150 bp sowie C und A von 170 bp. F, E1 und T1 trennten sich in mehrere Banden auf.

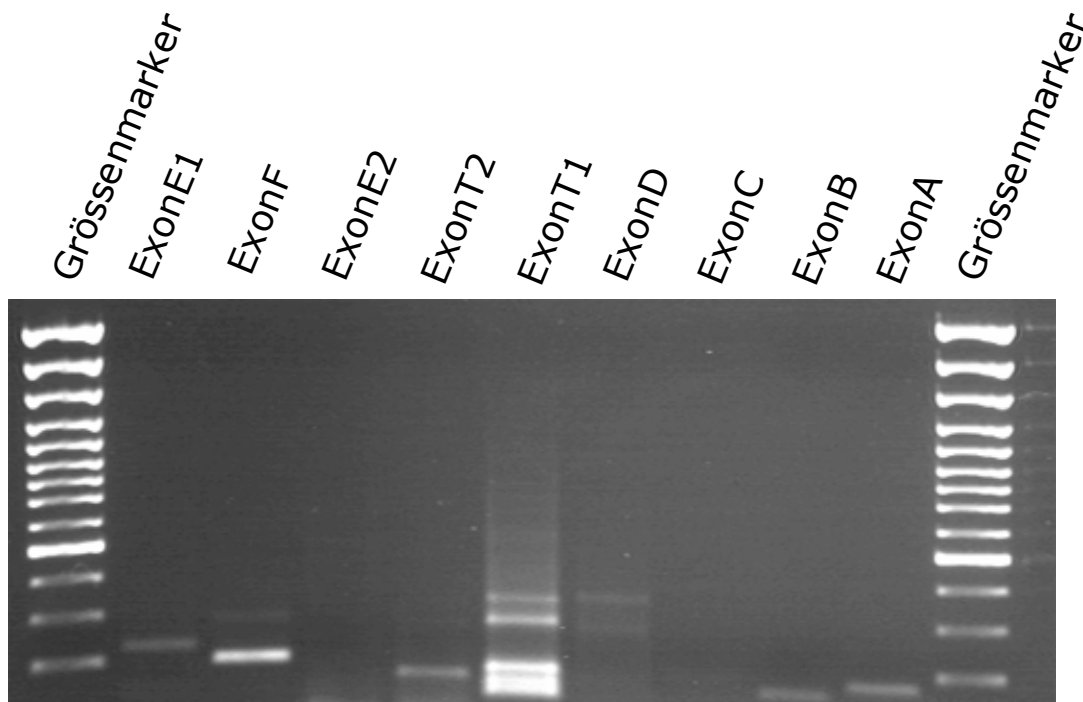


Abbildung 16: Untersuchung der untranslatierten Exons. Wie in Tabelle 9 dargestellt, wurde für jedes untranslatierte Exon eine nested PCR durchgeführt. Hier werden die Ergebnisse der zweiten PCR gezeigt. Die Darstellung setzt sich aus drei mit unterschiedlichen cDNAs durchgeführten Versuchsreihen zusammen.

4.2.4.1 Sequenzierung der PCR-Produkte

Bei den Neuroblastomzellen wurden die Versuchsreihen mit drei unterschiedlichen cDNAs durchgeführt. Für die erste Versuchsreihe wurde eine mRNA verwendet, in den darauf folgenden Versuchen wurde mit zwei totalen RNAs gearbeitet. Die Sequenzierungen ergaben bei der mRNA einen Identitätsnachweis der PCR-Produkte bei den Exons F und E1. Bei den totalen RNAs wurden die Identitäten der PCR-Produkte von Exons F, E1, T2, C und B bestätigt. Die Sequenzierungen zeigten folgende Übereinstimmungen mit publizierten Sequenzen:

Exon F: mit Genbank Einträgen U68068, AJ002562

Exon E1: mit Genbank Einträgen U68068, AJ002562

Exon T2: mit Genbank Einträgen AY425004, NM_000125

Exon C: mit Genbank Einträgen HSERG5UTA, AY425004

Exon B: mit Genbank Einträgen AY425004, AJ002560

Exon A: mit Genbank Einträgen AY425004, NM 000125

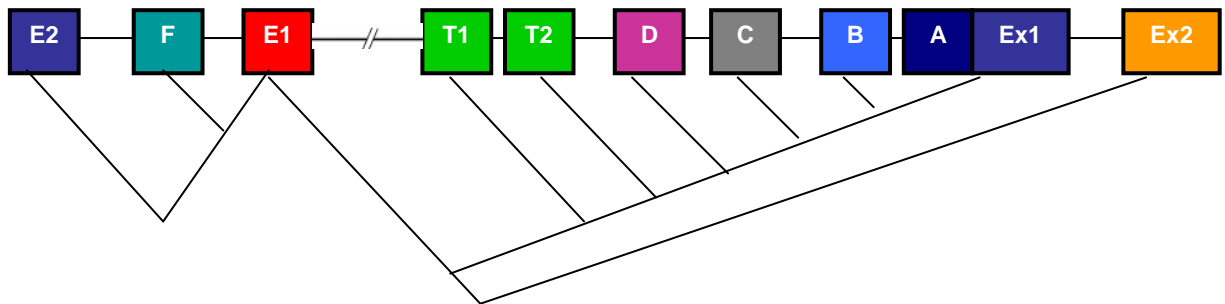
Die Sequenzierungen zeigten, dass Exons T2, C und B direkt an Exon 1 gespleißt wurden. Bei Exons F und E1 traten bei der mRNA und bei einer der beiden totalen RNAs Doppelbanden auf. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wies nach Verwendung von sense und antisense Primer eine Spleißvariante nach. Sowohl bei Nutzung von Exon F als auch von Exon E1 als Transkriptionsstartpunkt fungierte Exon E1 als Spleißdonor und Exon 2 als Spleißakzeptor. Exon 1 wurde übersprungen. Durch diese Spleißvariante waren die kleineren PCR-Produkte entstanden. Die Sequenzen der größeren PCR-Produkte zeigten die an Exon 1 gespleißten Exons F-E1 oder nur E1. Bei Verwendung der zweiten kompletten RNA trat bei Exons E1 und F nur ein PCR-Produkt auf. Diese Produkte entsprachen der eben genannten an Exon 1 gespleißten Variante.

Tabelle 13: Nachgewiesene untranslatierte Exons bei neuronalen Zellen

Ex1E2	EX1F	Ex1E1	Ex1T1	Ex1T2	Ex1D	Ex1C	Ex1B	ExA
-	+	+	-	+	-	+	+	+

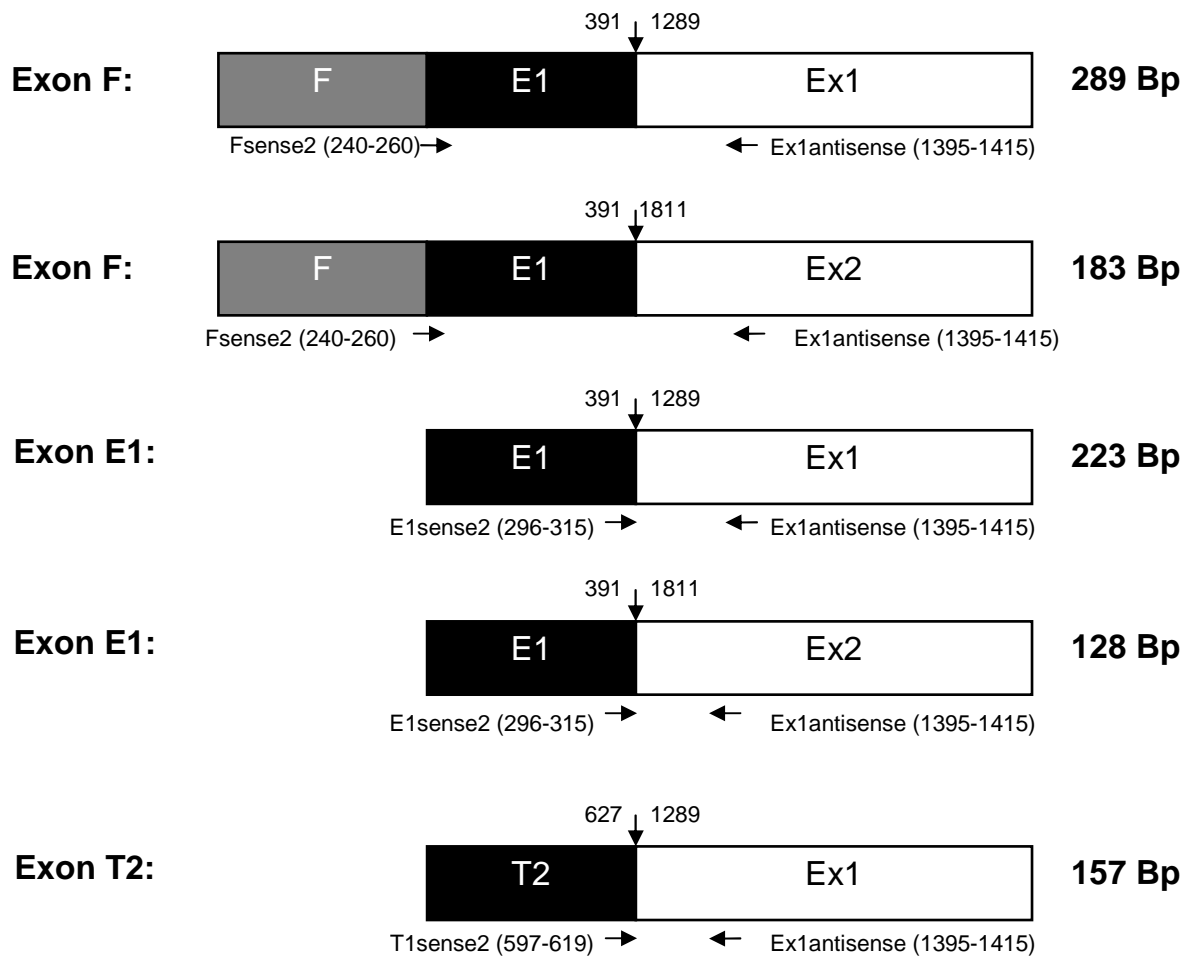
Legende zu Tabelle 13: Positive und negative Ergebnisse der Sequenzierungen bei Neuroblastomzellen. Alle Ergebnisse wurden durch die Verwendung einer zweiten unabhängigen cDNA bestätigt. In Abbildung 17b sind bei den neuronalen positiv nachgewiesenen mRNA-Varianten graphisch dargestellt.

Abbildung 17a: Die genomische Organisation der Promotorregion des humanen ER α Gens



Legende zu Abbildung 17a: Die Abbildung zeigt die bis zum heutigen Tag beschriebenen untranslatierten Exons des ER α Gens in der von Kos et al. vorgeschlagenen Reihenfolge. Die bunten Vierecke repräsentieren die untranslatierten Exons, die Zahlen in den Vierecken entsprechen der Größe des jeweiligen Exons in Basenpaaren. Die Zahlen zwischen den Exons korrespondieren mit der Größe der Introns in Kilobasenpaaren. Die Linien unterhalb der Exons stellen die Spleißvarianten dar.

Abbildung 17b: Nachgewiesene mRNA-Varianten bei neuronalen Zellen



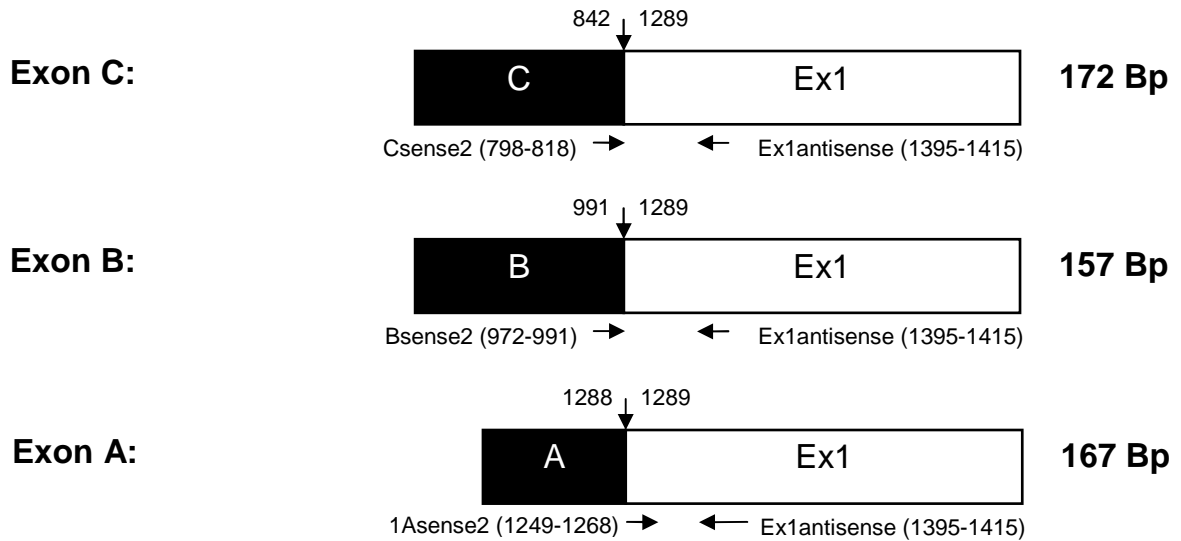


Abbildung 17b: Die Abbildungen darunter stellen die bei den hFOB Zellen nachgewiesenen mRNA-Varianten dar. Der senkrecht nach unten zeigende Pfeil markiert den Übergang vom untranslatierten Exon zum Exon 1 oder Exon 2. Die Zahl links des senkrechten Pfeils gibt die Position des letzten Basenpaares des untranslatierten Exons im ER α Gen an, die Zahl rechts des senkrechten Pfeils die Position des ersten Basenpaares des Exons 1 oder Exons 2 im ER α Gen. Unterhalb jeder mRNA-Variante sind die jeweils für die 2. PCR verwendeten Primer mit ihrer Position im ER α Gen angegeben. Die Zahl rechts von der Abbildung gibt die Größe der mRNA-Variante in der Sequenzierung (das heißt zwischen den beiden Primern der 2. PCR) in Basenpaaren an.

4.3 Expression des ER α in verschiedenen Differenzierungswegen von mesenchymalen Stammzellen

Bei den mesenchymalen Stammzellen handelt es sich um pluripotente Progenitorzellen, die sich in Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten und Myozyten differenzieren können. Es wird vermutet, dass Östrogene auf die Differenzierung in die einzelnen Zellphänotypen Einfluss nehmen und dass diese östrogene Wirkung durch Östrogenrezeptoren vermittelt wird.

In den folgenden Versuchen sollte deshalb überprüft werden, ob und in welchem Maß der ER α in den einzelnen Entwicklungsschritten der osteogenen und adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird.

Während der Differenzierung in Osteoblasten oder Adipozyten wurde deshalb zur Untersuchung der Östrogenrezeptorexpression wöchentlich eine RNA-Isolierung durchgeführt. Aus diesen RNAs wurde jeweils cDNA synthetisiert, deren Effektivität mit Hilfe

einer PCR mit EF1 α überprüft wurde (Abbildung 18). Anschließend sollte die ER α mRNA während der unterschiedlichen Differenzierungsphasen mit der RT-PCR Methodik nachgewiesen werden. Die verwendeten Primerpaare stammten dabei einmal aus der DNA-bindenden Domäne und in einer anderen Versuchsanordnung aus Exons 2 und 3. Die Versuche wurden an vier aus verschiedenen RNAs gewonnenen cDNAs durchgeführt.

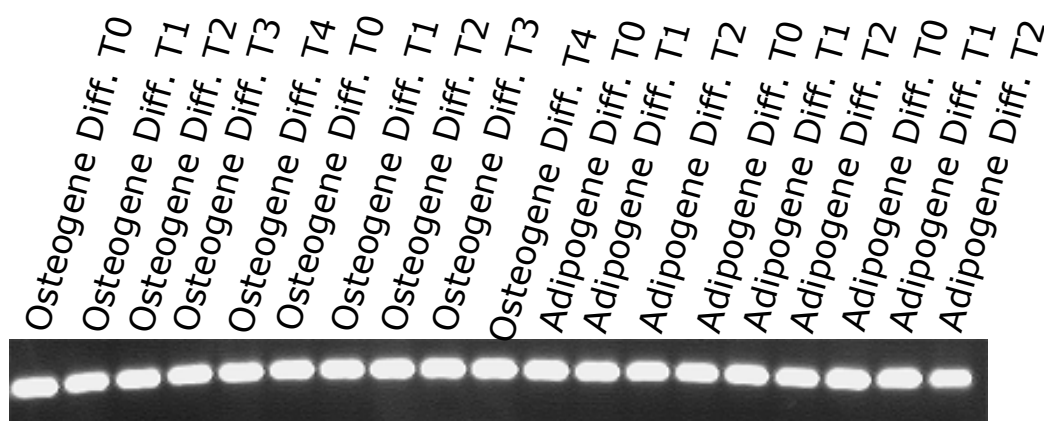


Abbildung 18: : Überprüfung der verwendeten cDNAs. Nach der Synthese wurde die Effektivität der cDNA-Herstellung durch eine PCR mit EF1 α kontrolliert. Die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese zeigte bei allen cDNAs Banden in erwarteter Größe.

4.3.1 Die Expression von ER α während der osteogenen Differenzierung

In der Postmenopause kann es zu einer Imbalance zwischen Knochenneubildung und Knochenresorption mit Überwiegen der Knochenresorption kommen. Eine Östrogen-substitution kann zur Wiederherstellung der Balance dieser beiden Vorgänge führen. Dies geschieht einerseits über eine Beeinflussung von osteoklastischen Zellen [Okazaki et al., 2002], andererseits konnte in einigen Studien auch eine Expression von ER α in osteoblastären Zellen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird vermutet, dass Östrogene auch eine Wirkung auf diese Zelllinie haben. Bei den Untersuchungen der Expression von ER α während der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen an aus vier verschiedenen RNAs gewonnenen cDNAs konnten keine einheitlichen Ergebnisse gefunden werden. In zwei Versuchsreihen wurde eine gleich bleibende Expression beobachtet, in den anderen beiden konnte eine Zunahme der Expres-

sion während der Differenzierung nachgewiesen werden. Aber auch bei den beiden letzteren unterschied sich der Zeitpunkt, an dem es zu einer gesteigerten Expression kam. Während es bei der einen Versuchsreihe erst nach drei Wochen zu einer kontinuierlichen Zunahme der Expression von ER α kam, konnte diese in der in Abbildung 19 dargestellten Versuchsreihe bereits nach einer Woche beobachtet werden.

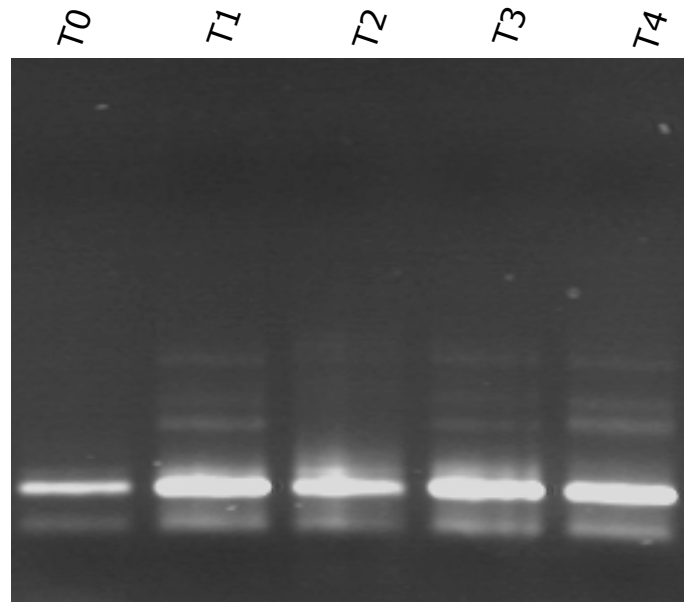


Abbildung 19: Expression des Östrogenrezeptors Alpha während der osteogenen Differenzierung: Die Abbildung zeigt die Expression des Rezeptors vor der Differenzierung (T0) und jeweils wöchentlich während der Differenzierung (T1, T2, T3, T4). Zur Überprüfung der Rezeptorexpression wurden zwei PCRs mit Primerpaaren aus der DNA-bindenden Domäne hintereinander durchgeführt. Während der Differenzierung ist eine leichte Zunahme der Intensität der Banden zu beobachten.

4.3.2 Die Expression von ER α während der adipogenen Differenzierung

Nach einer Ovariectomie und in der Postmenopause kann nicht nur eine Abnahme der Knochensubstanz, sondern auch eine Zunahme von Adipozyten im Knochenmark beobachtet werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Östrogene auch Adipozyten und die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in diesen Phänotyp beeinflussen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des ER α während der adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen mittels RT-PCR untersucht. Die Versuche wurden an vier aus verschiedenen RNAs gewonnenen cDNAs vorgenommen. Bei allen vier Versuchsreihen konnte eine kontinuierliche

liche Expression des ER α während der adipogenen Differenzierung beobachtet werden (siehe Abbildung 20).

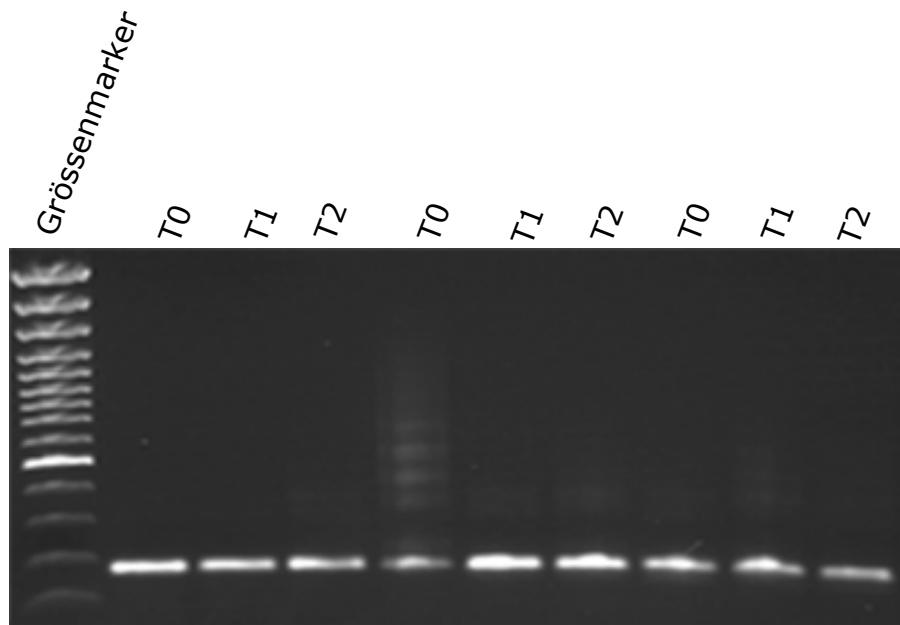


Abbildung 20: Die Abbildung zeigt drei verschiedene adipogene Differenzierungen. Zur Untersuchung der Östrogenrezeptorexpression wurden in diesem Versuch zwei PCRs mit Primern aus Exons 2 und 3 hintereinander durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Die Mitglieder der Superfamilie der nukleären Rezeptoren werden in einer Vielzahl von Organen und Zelllinien exprimiert. An den unterschiedlichen Expressionsorten variieren sowohl die Rezeptorspiegel als auch die Funktionen, die von ihnen beeinflusst werden. Um zu gewährleisten, dass die richtige Rezeptoranzahl in der richtigen Zelle und zum richtigen Zeitpunkt vorhanden ist, sind komplexe Kontrollen der Transkription und Translation notwendig. Eine Möglichkeit einer zellspezifischen Kontrolle ist die Expression unterschiedlicher Isoformen der Rezeptor-mRNA, die durch Nutzung alternativer Promotoren oder Spleißvorgänge generiert werden. Es entstehen Varianten, die sich entweder am N-Terminus oder am C-Terminus vom normalen Rezeptortranskript unterscheiden. Diese zell- und entwicklungspezifische Kontrollmöglichkeit wird von den Steroidhormonrezeptoren spezieübergreifend genutzt. So existieren beispielsweise zwei Progesteronrezeptorisoformen, die sich in ihrer N-terminalen Sequenz voneinander unterscheiden und abhängig von Zellart und Promotor in unterschiedlicher Effizienz Einfluss auf die Genexpression nehmen können [Tora et al., 1988; Vegeto et al., 1993; Chalbos, Galtier, 1994]. Aus der Nutzung alternativer Promotor bei Steroidhormonrezeptoren ergeben sich Ansatzpunkte zur Beeinflussung der Expression der Rezeptoren durch beispielsweise Einflussnahme auf den Promotor selbst oder die Transkriptionsfaktoren, die mit ihnen interagieren.

1991 wurde erstmals von einer 5'-flankierenden Region des humanen ER α berichtet [Keaveney et al., 1991]. Seitdem wurden mittlerweile neun untranslatierte Exons beschrieben, die als alternativer Transkriptionsstartpunkt genutzt werden können und durch Spleißen an die kodierenden Exons gebunden werden. Die durch Nutzung dieser alternativen Exons entstandenen mRNA-Isoformen wurden in unterschiedlichen Expressionsmustern in den bis jetzt untersuchten Organen und Zelllinien gefunden.

Die Nutzung dieser untranslatierten Exons durch Osteoblasten, mesenchymale Stammzellen, Chondrozyten und Neuronen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Verwendung der alternativen Promotoren wird anschließend bei Osteoblasten und neuronalen Zellen anhand von Ergebnissen aus der Literatur diskutiert, während sie bei MSCs und Chondrozyten erstmalig untersucht wurde. Die Verteilung der unterschiedli-

chen mRNA-Isoformen in den untersuchten Zellen und ihre Bedeutung für die Regulation der Rezeptorexpression werden nach der Diskussion relevanter Aspekte der verwendeten Zelllinien und Methodik erörtert.

5.2 Verwendung von hFOB 1.19, C-28/I2 und SK-N-SH als Modellsysteme

Um die Expression des ER α in den gewünschten Zelllinien untersuchen zu können, mussten Modellsysteme verwendet werden, die einerseits den Phänotyp der jeweiligen Zelllinie exprimieren und andererseits homogen und reproduzierbar sind.

Primärkulturen humaner Osteoblasten exprimieren zwar den gewünschten osteoblastären Phänotyp, haben aber den entscheidenden Nachteil der langsamen Proliferation und schnellen Alterung. Aus einem Osteosarkom gewonnene Zelllinien proliferieren zwar schnell, bergen aber die Unsicherheit eines veränderten Phänotyps. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden fetale Osteoblasten als Modellsystem verwendet, die mit dem Gen für die temperatursensitive Mutante des large T-Antigens des SV 40-Virus transfiziert worden waren. Die Expression des T-Antigens ist bei den hFOB 1.19 an eine Kultivierung bei 33.5°C gebunden. Das Antigen interagiert mit dem Zellzyklus und führt so zu einer erhöhten Proliferationsrate der humanen Zelllinie. Die transfizierten Zellen exprimieren trotz des veränderten Proliferationsparameters osteoblastäre Phänotypmarker wie alkalische Phosphatase, Osteopontin, Sialoprotein und Typ I Kollagen. Ein weiteres Zeichen der osteoblastären Differenzierung ist die Mineralisierung der Matrix bei postkonfluenten Zellen. Die immortalisierte hFOB 1.19 Zelllinie „bietet somit ein homogenes, schnell proliferierendes Modellsystem zur Untersuchung unterschiedlicher Stadien der humanen Osteoblastendifferenzierung“ [Harris et al., 1995].

Zur Untersuchung der Chondrozyten wurde ebenfalls eine mit dem large T-Antigen des SV 40-Virus transfizierte Zelllinie verwendet [Goldring, 2000]. Diese Zelllinie ermöglicht im Gegensatz zur Primärkultur humaner Chondrozyten ein reproduzierbares Modellsystem. Nachteile der primären humanen Chondrozyten sind unter anderen ihre nur mit Schwierigkeiten durchzuführende Isolierung beim Erwachsenen und ihre phänotypischen Unterschiede, die durch das Alter und andere Bedingungen des Patienten wie Gewicht und Lebensweise bedingt sind. Bei den primären Chondrozyten des Erwachsenen handelt es sich außerdem hauptsächlich um postmitotische Zellpopulationen, die nach ihrer Isolierung kaum noch proliferieren. Eine proliferative Aktivität dieser Zellen ist mit einem Verlust ihres differenzierten Phänotyps verbunden.

Die immortalisierten Chondrozyten proliferieren kontinuierlich in Kultur und behalten ihre chondrozytäre Morphologie. Die Immortalisierung führt allerdings zu Veränderungen der Genexpression. Diese äußern sich in einer vermehrten Expression von Genen des Zellzyklus und einer verminderten Expression von Matrixproteinen und – proteasen [Finger et al., 2003]. Die verwendete Zelllinie C-28/I2 zeigt im Vergleich mit anderen immortalisierten chondrozytären Zelllinien die meisten Übereinstimmungen mit dem Phänotyp der primären Chondrozyten. Sie exprimiert, wenn auch nur in geringem Maße, sowohl anabole als auch katabole Matrixgene und zeigt den höchsten Expressionspiegel von Genen der Zelldifferenzierung wie SOX9. Die Zelllinie C-28/I2 bietet somit die Möglichkeit, Chondrozyten unter reproduzierbaren und definierten Bedingungen zu untersuchen.

Die SK-N-SH ist eine Neuroblastomzelllinie humaner Herkunft. Sie exprimiert einen neuronalen Phänotyp und bietet somit die für die Untersuchung des Östrogenrezeptors benötigten Voraussetzungen einer hohen Proliferationsrate und eines zellspezifischen Phänotyps.

5.3 Die nested PCR im Vergleich mit anderen Methoden

Um die Nutzung der untranslatierten Exons in den Zelllinien und die Expression des ER α in unterschiedlichen Differenzierungsschritten zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit hauptsächlich nested PCRs und anschließend Sequenzierungen verwendet. Die RT-PCR hat gegenüber anderen Methoden wie der in situ Hybridisierung und dem Southern Blot den Vorteil, dass unspezifische Produkte durch die anschließende Sequenzierung ausgeschlossen werden können. Außerdem können PCR-Produktvarianten durch die Sequenzierung sofort charakterisiert werden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass ihre Sensitivität sehr stark von der Primerauswahl abhängig ist. Da der ER α mRNA-Gehalt in den untersuchten Zelllinien gering ist, könnte die Verwendung eines weniger sensitiven Primerpaares zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Dieser methodische Nachteil wird durch das Arbeiten mit nested PCRs relativiert, da die Durchführung von zwei PCRs hintereinander zu einer Anhebung der Nachweisgrenze um bis zu drei Zehnerpotenzen führt [Jackson et al., 1991]. Eine andere Fehlerquelle der PCR wird wiederum durch die nested PCR verstärkt. So ist die nested PCR durch Einsatz von PCR-Produkten statt cDNA in der zweiten PCR deutlich anfälliger für Kontamination. Diese

Kontamination kann neben einem niedermolekularen Hintergrund in der Gelelektrophorese auch eine Unlesbarkeit der Sequenzanalyse zur Folge haben.

5.4 Nachweis des ER α in den untersuchten Zelltypen

Bevor die Nutzung der acht untranslatierten Exons und des nicht unabhängigen Exons A in den verschiedenen Zelllinien überprüft werden konnte, musste zunächst die Expression des ER α nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde eine nested PCR mit Primerpaaren aus der DNA-bindenden Domäne durchgeführt. Die cDNA einer Mamzelllinie diente bei dieser Versuchsreihe als Positivkontrolle. Aufgrund des hohen Expressionslevels der ER α mRNA in dieser Zelllinie war eine spezifische Bande in erwarteter Größe schon nach der ersten PCR sichtbar. Eine etwas schwächer ausgeprägte Bande gleicher Größe war auch bei den mesenchymalen Stammzellen nach einer PCR zu erkennen, was für einen hohen Gehalt an ER α mRNA in diesen Zellen spricht. Nach der zweiten PCR war die spezifische Bande auch bei der Gelelektrophorese der Neuroblastomzellen, der Chondrozyten und humanen fetalen Osteoblasten zu sehen. Nach der Gelelektrophorese wurden alle Ergebnisse durch eine Sequenzanalyse überprüft, um die Spezifität der PCR-Produkte nachzuweisen.

5.5 Die Nutzung der untranslatierter Exons bei osteoblastären Zellen

Die Folgen des Östrogenmangels in der Postmenopause und die Untersuchungen an einem Mann mit einer Mutation im ER α Gen zeigen, wie wichtig das Hormon und seine Vermittlung über den Rezeptor für das Knochenwachstum und den Erhalt des Knochens sind. Der Mangel an Östrogenen führt in der Postmenopause zu einer negativen Skelettbilanz durch Überwiegen der Knochenresorption gegenüber der Knochenneubildung. Durch den Verlust an spongiosen Knochen kann es bei mechanischer Belastung zu pathologischen Frakturen kommen.

Schwerwiegende Veränderungen wie vermehrtes Längenwachstum des Knochens, fehlender Epiphysenfugenschluss, schwere Osteoporose und verminderte Mineralisierung des Knochens waren auch bei Mutation des ER α Gens zu beobachten [Smith et al., 1994].

Im Gegensatz dazu sprechen Beobachtungen an der ER β KO Maus für lediglich geringe repressive Effekte des ER β auf den Knochen und seinen Erhalt. Diese Beobachtungen korrelieren mit den nicht durch die quantitative S1 Nuklease Analyse detektierbaren Expressionsspiegel des humanen ER β Proteins in humanen Osteoblasten [Denger et al., 2001b].

Der ER α wird hingegen sowohl in Osteoblasten als auch in Osteoklasten, den beiden für eine ausgewogene Knochenbilanz verantwortlichen Zelllinien, exprimiert [Oursler et al., 1991; Ikegami et al., 1994]. Die Beeinflussung von Funktionen und Entwicklung des osteogenen Gewebes durch Östrogene scheint dementsprechend fast ausschließlich über den ER α vermittelt zu werden. Dabei zählen die Osteoblasten zu den Zelllinien mit einem niedrigen mRNA-Spiegel des ER α . Ihr mRNA Gehalt liegt beispielsweise 200-fach unter dem der MCF-7, einer Mammakarzinomzelllinie [Denger et al., 2001]. Diese zellspezifischen niedrigen Transkriptspiegel unterliegen Kontrollen auf der Ebene der Transkription sowie der Translation. Kontrollmöglichkeiten sind die Nutzung multipler Promotoren und das alternative Spleißen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die immortalisierte osteoblastäre Zelllinie hFOB 1.19 als Modellsystem verwendet. Zur Untersuchung der untranslatierten Exons wurden zwei PCRs (45 Zyklen) als nested PCRs hintereinander durchgeführt. Die sense Primer stammten dabei aus dem jeweiligen untranslatierten Exon, die antisense Primer lagen in Exons 1 und 2. Die Ergebnisse der PCR wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Sequenzierung überprüft. Ergebnis dieser Arbeit war eine Nutzung der untranslatierten Exons (A), B, C, E1 und F bei den Osteoblasten, während eine Verwendung der Promotoren E2, T1, T2 und D nicht nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich konnte bei Nutzung der Exons F und E1 noch eine Spleißvariante festgestellt werden, bei der Exon 1 übersprungen wird und entweder Exons F-E1 oder bei Nutzung von Exon E1 als Transkriptionsstartpunkt nur Exon E1 an Exon 2 gespleißt werden. Diese mRNA-Varianten führen zu einem um die A/B-Domäne verkürzten ER α .

Die Verwendung von untranslatierten Exons des ER α bei Osteoblasten wurde auch schon in einigen früheren Studien überprüft. So untersuchten Grandien et al. im Jahr 1995 eine Nutzung der damals als A und B bezeichneten untranslatierten Exons in osteoblastären Zelllinien mit Hilfe der PCR-Methode. Nach heutiger Nomenklatur entspre-

chen sie Exons A und C. Als Modellsystem dienten neben primären humanen Osteoblasten auch die Osteosarkomzelllinie HOS-D4. Ergebnis der Untersuchung war eine Nutzung des distalen Promotors (Promotor C) in beiden osteoblastären Zelllinien. Eine Verwendung des proximalen Promotors (Promotor A) wurde nicht detektiert [Grandien et al., 1995].

Einige Jahre später stellten Flouriot und seine Arbeitsgruppe mit Hilfe von RT-PCR und der S1 Nuklease Methodik nach Untersuchung der Promotor A, B, C, D, E2 und F eine ausschließliche Nutzung der Promotoren E2 und F als Transkriptionsstartpunkte in osteoblastären Zellen fest. Als Modellsystem verwendeten sie dabei zwei verschiedene osteoblastäre Zelllinien, SaOs (Osteosarkomzellen) und HOS [Flouriot et al., 1998]. Andere Studien mit SaOs detektierten ebenfalls E2-ER α und F-ER α Isoformen, wobei die Versuche mit S1 Nuklease darauf hindeuteten, dass in osteoblastären Zellen hauptsächlich der F Promotor als Startpunkt der Transkription genutzt wird [Denger et al., 2001].

Neben der Nutzung multipler Promotoren wurden verschiedene alternative Spleißvarianten des ER α in den Osteoblasten gefunden, die zur Expression von Östrogenrezeptorvarianten mit Molekulargewichten von 66, 46 und 39 kDa führen [Reid et al., 2002]. Bei einer Spleißvariante, die in der Expression eines 46 kDa Rezeptors resultiert, wird Exon 1 vollständig übersprungen. Exon E1 dient hierbei als Spleißdonor, wobei sich der Spleißakzeptor in Exon 2 befindet. Mit Hilfe von quantitativen PCR Verfahren wurde festgestellt, dass 50% des gesamten Transkripts der Osteoblasten dieser Spleißvariante entsprechen [Denger et al., 2001].

In der vorliegenden Arbeit konnten dementsprechend die in der Literatur bei Osteoblasten beschriebene Nutzung der untranslatierten Exons C und F als Startpunkte der Transkription sowie die Existenz der durch alternative Spleißvorgänge generierten verkürzten Transkriptisoformen bestätigt werden. Erstmals wurde außerdem eine Verwendung der Exons (A), B und E1 als Transkriptionsstartpunkte festgestellt. Ursachen für die von der Literatur abweichenden Ergebnisse wie der erstmalige Nachweis der Nutzung der bereits untersuchten Exons (A) und B in dieser Arbeit und der fehlende Nachweis des bereits beschriebenen Exons E2 können sowohl die Verwendung unterschiedlicher Modellsysteme sowie unterschiedlich sensitiver Primer sein.

5.6 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei neuronalen Zellen

Im Gehirn beeinflussen Östrogene reproduktive Funktionen wie das neuroendokrine System des Hypothalamus und der Hypophyse. Zusätzlich wurde eine Beeinflussung von Kognition, Stimmung und Gedächtnis festgestellt [McEwen et al., 1997; Fink et al., 1998]. Die genauen Mechanismen der östrogenen Einflussnahme auf diese Funktionen sind noch nicht bekannt, doch wurden in einigen Tiermodellen Auswirkungen einer Östrogensubstitution auf den Hippocampus beobachtet. Bei Ratten wurde unter Östrogeneinfluss eine Vermehrung der Dendritenanzahl, eine Erhöhung der Synapsendichte und ein Anstieg von prä- und postsynaptischen Proteinen in der CA1 Region des Hippocampus erzielt [Choi et al., 2003; Woolley, 1998]. Auch der durch die Ovariectomie der Ratte hervorgerufene Mangel an Cholinacetyltransferase konnte durch die Gabe von Östrogenen rückgängig gemacht werden [Wu et al., 1999].

Eine Expression des ER α konnte aber nicht nur im Hippocampus, sondern auch in anderen Regionen des Gehirns wie in der temporalen Kortex, in den Amygdala und dem Hypothalamus nachgewiesen werden [Österlund et al., 2000; Shughrue et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der Nutzung der acht untranslatierten Exons und des Exons A als Transkriptionsstartpunkte ein genereller neuronaler Phänotyp verwendet. Als Modellsystem diente hierbei die Neuroblastomzelllinie SK-N-SH. Um die Nutzung der acht untranslatierten Exons und des Exons A in dieser neuronalen Zelllinie nachzuweisen, wurden neun nested PCRs mit antisense Primern aus Exons 1 und 2 und sense Primern aus dem jeweils untersuchten 5'-flankierendem Exon durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse durch Sequenzierungen aller PCR-Produkte überprüft. Mit Hilfe dieser Methodik wurde bei den SK-N-SH eine Verwendung der untranslatierten Exons F, E1, T2, C und B und (A) als Startpunkte der Transkription festgestellt, während eine Nutzung der Exons E2, T1 und D nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Nutzung der Promotoren (A), B und C wurde bereits im Jahr 2000 von Österlund et al. in unterschiedlichen Gehirnregionen (temporale Kortex, Amygdala, Hypothalamus, Hippocampus, Striatum) untersucht. Hierbei wurden mit in situ Hybridisierung und RT-PCR regionenspezifische Expressionsmuster gefunden. Die durch Verwendung des Exons A als Startcodon entstandene mRNA-Isoform wurde mit der RT-PCR Methode nur im Hypothalamus nachgewiesen, während sie mit der in situ Hybridisierung in geringen

Mengen in der Mehrzahl der untersuchten Gehirnregionen gefunden wurde. Die durch Exon B generierte mRNA-Isoform wurde mit RT-PCR im Hypothalamus und der temporalen Kortex nachgewiesen, die in situ Hybridisierung zeigte eine Expression in höherer Quantität in einigen Bereichen des Hypothalamus und der Amygdala während diese Isoform in anderen Regionen wie der temporalen Cortex kaum detektierbar war. Die mRNA-Variante mit Exon C als Transkriptionsstartpunkt wurde sowohl mit RT-PCR als auch mit in situ Hybridisierung in keinem der Gehirnbereiche nachgewiesen [Österlund et al., 2000].

Im Gegensatz zu der Studie von Österlund verwendeten Flouriot und seine Arbeitsgruppe als Modellsystem einen allgemeinen neuronalen Phänotyp ohne Unterscheidung einzelner Gehirnregionen [Flouriot et al., 1998]. Mit Hilfe der RT-PCR wiesen sie eine Nutzung der Exons F, E2, C, B und A als Transkriptionsstartpunkte im Gehirn nach. Eine Verwendung des ebenfalls untersuchten Exons D konnte nicht festgestellt werden, während Untersuchungen der Exons T1 und T2 in dieser Studie nicht vorgenommen wurden. Die Nutzung der einzelnen untranslatierten Exons wurde durch nested PCR-Reaktionen überprüft, wobei die sense Primer in den einzelnen zu untersuchenden Exons lagen, während die antisense Primer aus Exon 8 stammten.

Zusätzlich zur RT-PCR wurde in der oben genannten Studie die S1 Nuklease Methodik verwendet, mit der aber keine mRNA-Variante des ER α durch Verwendung untranslatierter Exons nachgewiesen werden konnte. Dies könnte an den geringen Expressionsleveln der einzelnen Transkriptisoförmn im Gehirn liegen [Flouriot et al., 1998].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen der bereits weiter oben erwähnten Studie einzelner Gehirnregionen, die weder mit RT-PCR noch mit in situ Hybridisierung durch Exon C generierte mRNA-Isoformen nachgewiesen hatte. Zur Detektion der unterschiedlichen mRNA-Isoformen wurde in dieser Studie für jedes Exon nur jeweils eine PCR-Reaktion durchgeführt. Dieser Unterschied in der Methodik könnte ursächlich für die Diskrepanz der Ergebnisse sein, da das Arbeiten mit zwei hintereinander durchgeführten PCRs zur Anhebung der Nachweisgrenze um bis zu drei Zehnerpotenzen führt [Jackson et al., 1991].

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen hingegen viele Übereinstimmungen mit den von Flouriot et al. veröffentlichten Ergebnissen. Die Nutzung der Exons F, C und B

im Gehirn konnte bestätigt werden. Wie in der Studie von Flouriot konnte eine Verwendung des Exons D mit der RT-PCR Methodik nicht festgestellt werden. Zusätzlich wurden erstmalig die Exons E1 und T2 als Startkodons nachgewiesen, die in bisher veröffentlichten Studien nicht untersucht worden waren.

5.7 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei mesenchymalen Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks sind pluripotente Progenitorzellen, die sich sowohl zu Adipozyten als auch zu Osteoblasten differenzieren können [Okazaki et al., 2002]. Studien an ovariectomierten Mäusen geben Hinweise auf eine Einflussnahme von Östrogenen auf die Funktionen und das intrinsische Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen. Unter Östrogenmangel kommt es zu einer signifikanten Abnahme der proliferativen Aktivität der MSCs, die Apoptoserate der Zelllinie ist in *in vitro* Studien um 50 % erhöht, während die Expression osteogener Marker und somit die osteogene Differenzierung reduziert ist [Zhou et al., 2001]. Diese durch einen Mangel des Hormons hervorgerufenen Effekte können durch eine externe Östrogensubstitution rückgängig gemacht werden. Bei gleichzeitiger Gabe von Östrogenrezeptorblockern kommt es zu einer Antagonisierung der östrogenen Wirkungen, was für eine Vermittlung der Effekte auf die mesenchymalen Stammzellen durch Rezeptoren spricht.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei den mesenchymalen Stammzellen relativ hohe Expressionsspiegel der ER α mRNA gefunden. Diese waren deutlich höher als in allen anderen untersuchten Zelllinien. Bei der erstmaligen Untersuchung der Nutzung der acht untranslatierten Exons und des Exons A bei den MSCs wurde eine Verwendung der Exons F, E1, T2, C, B und (A) als Startpunkte der Transkription festgestellt, während eine Nutzung der Exons E2, T1 und D nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass es auch bei den mesenchymalen Stammzellen eine Kontrolle der Expression von ER α durch Nutzung multipler Promotoren gibt. Dieser Nachweis könnte ein Ansatzpunkt der Einflussnahme auf die pluripotente Vorläuferzelle sein, aus der sich sowohl Osteoblasten als auch Adipozyten differenzieren. Wie bereits weiter oben beschrieben wurde, scheinen Östrogene ein Regulator dieser entgegengesetzten Differenzierung zugunsten der osteogenen Differenzierung zu sein. Über die Beeinflussung der alternativen Promotoren könnte somit eine Möglichkeit bestehen, die Expressionsspiegel von ER α zu verän-

dern und somit eine osteogene oder adipogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu fördern.

5.8 Die Nutzung der untranslatierten Exons bei Chondrozyten

Veränderungen bei einem Mann mit einer Mutation des ER α Gens und bei Kindern mit Pubertas praecox sprechen für die Bedeutung von Östrogenen für das Längenwachstum des Knochens und den Epiphysenfugenschluss. Die Mutation des ER α Gens führt zu vermehrtem Längenwachstum des Knochens und verzögertem Schluss der Epiphysenfugen [Smith et al., 1994], während sich die Epiphysenfuge bei Kindern mit Pubertas praecox durch vorzeitige Östrogenexposition verfrüht schließt, was in einem reduzierten Längenwachstum resultiert [Sigurjonsdottir, Hayles, 1968].

Das Längenwachstum des Knochens wird durch einen synchronisierten Prozess der Chondrogenese und der Ossifikation hervorgerufen. Die Chondrogenese besteht dabei aus Proliferation, Hypertrophie und anschließender Matrixsekretion. Mit fortschreitendem Alter kommt es zu einer Abnahme der proliferativen Aktivität der Chondrozyten [Kember, Walker, 1971; Walker, Kember, 1972; Tonna, 1961], die von strukturellen Veränderungen der Epiphysenfuge begleitet wird. Es kommt zu einer Verminderung der Wachstumsfughöhe [Masoud et al., 1986] und der Höhe der hypertrophischen Zone sowie zu einer Abnahme der hypertrophen Chondrozyten. Durch Abnahme der Chondrogenese gegenüber der Ossifikation kommt es zum Zeitpunkt der sexuellen Reifung zum Schluss der Epiphysenfuge.

Der schon durch Veränderungen am Menschen vermutete Einfluss von Östrogenen auf diese Prozesse wurde in Studien mit Tiermodellen untersucht. In Modellen an Hasen, deren Wachstumsfugen sich wie beim Menschen zum Zeitpunkt der sexuellen Reife schließen, konnte eine Beschleunigung dieses Prozesses unter Östrogensubstitution nachgewiesen werden. Als Ursache wurde eine Verringerung der proliferativen Kapazität der Chondrozyten durch Östrogene vermutet [Weise et al., 2001]. Der in Studien beschriebene Nachweis des ER α in Chondrozyten spricht für eine Bedeutung des Hormons in dieser Zelllinie und die Vermittlung von östrogenen Wirkungen durch den Rezeptor [Nilsson et al., 2002; Ushiyama et al., 1999].

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Verwendung von nested PCRs erstmalig die Nutzung der acht untranslatierten Exons (F-B) und des Exons A bei Chondrozyten un-

tersucht. Als Modellsystem diente hierbei die immortalisierte chondrozytäre Zelllinie C-28/I2. Ergebnis der Versuchsreihen war eine Nutzung der untranslatierten Exons F, E1, T2, C, B und (A). Die ebenfalls untersuchten Exons E2, T1 und D konnten nicht als Startpunkte der Transkription nachgewiesen werden.

Diese Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von ER α auch bei den Chondrozyten über die Nutzung multipler Promotoren kontrolliert wird.

Durch diese Beobachtung ergeben sich neue Fragestellungen: Welcher Promotor wird hauptsächlich bei Chondrozyten genutzt? Ändert sich die anteilige Nutzung der sechs alternativen Promotoren, die bei Chondrozyten nachgewiesen werden konnten während der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen stadienabhängig? Ist durch Inhibition oder Förderung des hauptsächlich genutzten Promotors eine Beeinflussung des Längenwachstums der Knochen ohne Veränderung anderer Organe möglich?

5.9 Die untranslatierten Exons des ER α

Seit der zufälligen Entdeckung der 5'-flankierenden Region des ER α Gens im Jahr 1991 [Keaveney et al., 1991] sind mittlerweile 8 untranslatierte Exons und ein nicht unabhängiges Exon A beschrieben. Durch Untersuchungen in verschiedenen Geweben und Zelllinien wurden bisher 12 Isoformen der Rezeptor mRNA gefunden, die durch Nutzung dieser untranslatierten Exons und alternatives Spleißen generiert werden. Dabei wurden die Exons (A), B, C, D, T1, F und E2 als Startpunkte der Transkription beschrieben, während Exons T2 und E1 in den bisherigen Untersuchungen nur als zwischengeschaltete zweite Exons erwähnt wurden. In Studien der Promotorregion des ER α wurden mRNA Isoformen nachgewiesen, die durch Bindung der Exons (A), B, C, D, T1, F und E2 direkt an die Spleißakzeptorstelle in Exon 1 entstanden sind, sowie mRNA Varianten bei denen jeweils zwei Exons E2-E1, F-E1, T1-T2 an Exon 1 gespleißt werden (Nomenklatur der von Kos et al., 2001 vorgeschlagenen angeglichen) [Okuda et al., 2003]. Bei Verwendung der Exons F und E2 als Startpunkte der Transkription wurden zwei weitere mRNA Isoformen beschrieben, die durch Bindung von F-E1 oder E2-E1 an eine Spleißakzeptorstelle in Exon 2 generiert werden [Denger et al., 2001].

Um eine Vergleichbarkeit der bisher beschriebenen Untersuchungsergebnisse zu ermöglichen, wurden die uneinheitlichen Bezeichnungen der untranslatierten Exons der von Kos et al. im Jahr 2001 vorgeschlagenen Nomenklatur angeglichen [Kos et al., 2001].

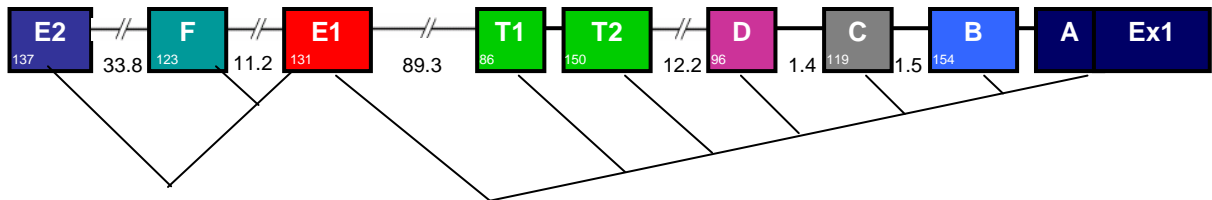


Abbildung 21: Die genomische Organisation der Promotorregion des humanen ER α Gens. Die Abbildung zeigt die bis zum heutigen Tag beschriebenen untranslatierten Exons des ER α Gens. Die bunten Vierecke repräsentieren die untranslatierten Exons mit den von Kos et al. vorgeschlagenen Namen. Die Zahlen in den Vierecken entsprechen der Größe des jeweiligen Exons in Basenpaaren. Die Zahlen zwischen den Exons korrespondieren mit der Größe der Introns in Kilobasenpaaren.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Untersuchungen an neuronalen Zellen übereinstimmend mit der Literatur eine Nutzung der Exons (A), B, C und F als alternative Promotoren nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den in der Literatur verwendeten untranslatierten Exons konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine Verwendung der Exons E1 und T2 als Startpunkte der Transkription bei neuronalen Zellen beobachtet werden. Diese beiden untranslatierten Exons wurden bisher ausschließlich als zwischengeschaltete zweite Exons beschrieben. Bei Nutzung des Exons E1 sowie des Exons F als Transkriptionsstartpunkte konnte des Weiteren erstmalig bei neuronalen Zellen ein alternativer Spleißvorgang beobachtet werden, bei dem Exon E1 bzw. Exons F-E1 an Exon 2 gebunden werden. Wie auch schon in einer Studie von Flouriot et al., 1998 festgestellt wurde, konnte keine Nutzung des untranslatierten Exons D als Transkriptionsstartpunkt in dieser Zelllinie beobachtet werden. Ebenfalls negativ waren die Untersuchungsergebnisse bei dem bis jetzt noch nicht in neuronalen Zellen untersuchten Exon T1. Im Gegensatz zur Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit auch keine Verwendung des Exons E2 als alternativer Promotor nachgewiesen werden [Flouriot et al., 1998].

Hohe Übereinstimmungen mit der Literatur wurden bei der Nutzung der untranslatierten Exons C und F als Startpunkte der Transkription bei osteoblastären Zellen gefunden

[Flouriot et al., 1998]. Auch die bereits in der Literatur bei Osteoblasten beschriebene Variante, bei der Exons F-E1 durch alternatives Spleißen direkt an Exon 2 gebunden werden, konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden [Denger et al., 2001]. Bei den osteoblastären Zellen konnte ebenfalls zum ersten Mal eine Nutzung des Exons E1 als Transkriptionsstartpunkt beobachtet werden, wobei bei Verwendung dieses Exons sowohl Exon 1 als auch Exon 2 als Spleißakzeptor fungierten. Das untranslatierte Exon E1 wurde zwar schon in früher veröffentlichten Studien als Spleißdonor sowohl für Exon 1, als auch für Exon 2 beschrieben, trat aber in diesem Zusammenhang immer nur als zweites Exon auf, das entweder an Exon E2 oder Exon F gespleißt war. Zusätzlich wurde bei den osteoblastären Zellen eine Nutzung der Exons (A) und B festgestellt. Diese beiden Exons waren bei bisher veröffentlichten Studien negativ geblieben [Flouriot et al., 1998; Denger et al., 2001]. Die in der Literatur beschriebene Verwendung des Exons E2 als Transkriptionsstartpunkt konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden [Denger et al., 2001].

Eine Verwendung der acht untranslatierten Exons und des Exons A als Startpunkte der Transkription bei mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten wurde durch die vorliegende Arbeit zum ersten Mal untersucht. Aus diesem Grund konnten keine Vergleiche mit der Literatur vorgenommen werden. Sowohl bei den mesenchymalen Stammzellen als auch bei den Chondrozyten konnte übereinstimmend eine Nutzung der Exons (A), B, C, T2, E1 und F nachgewiesen werden.

Aufgrund der hohen Übereinstimmung mit der Literatur bei der Nutzung der untranslatierten Exons (A), B, C und F als Transkriptionsstartpunkte bei den neuronalen Zellen und bei der Nutzung von Exons C und F bei den osteoblastären Zellen sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit valide.

Auch bei den bisher nicht untersuchten oder negativ gebliebenen untranslatierten Exons kann aufgrund der Verwendung einer spezifischen RT-PCR mit Primern aus der Literatur und anschließender Bestätigung der Ergebnisse durch Sequenzierungen davon ausgegangen werden, dass es sich um valide Daten handelt.

Divergente Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur traten bei der Verwendung des untranslatierten Exons E2 als Transkriptionsstartpunkt auf. Dieses Exon blieb in der vorliegenden Arbeit in allen vier untersuchten Zelltypen negativ. In der Literatur wurde es aber sowohl bei den osteoblastären als auch bei den neuronalen Zellen als alternativer

Promotor nachgewiesen [Flouriot et al., 1998; Denger et al., 2001]. Ein Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Verwendung verschiedener zellulärer Modellsysteme sein. In den Arbeiten von Flouriot et al., 1998 wurden bei der Untersuchung des osteoblastären Zellphänotyps ausschließlich Osteosarkomzellen verwendet. In der Studie von Denger et al., 2001 wurde sowohl mit Osteosarkomzellen als auch mit primären humanen Osteoblasten gearbeitet. Beide Modellsysteme haben entscheidende Nachteile. Während die Osteosarkomzellen die Gefahr eines veränderten Phänotyps bergen, proliferieren Primärkulturen humaner Osteoblasten nur langsam und altern schnell. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit fetale Osteoblasten, die mit dem Gen für die temperatursensitive Mutante des large T-Antigens des SV 40-Virus transfiziert worden waren, als Modellsystem verwendet.

Eine weitere Ursache für die negativen Ergebnisse könnten die für das untranslatierte Exon E2 verwendeten Primer oder PCR-Bedingungen sein. Diese Primer stammen allerdings aus der Literatur und wurden schon für den Nachweis von Exon E2 verwendet. Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit eine Nutzung der untranslatierten Exons (A), B, C, E1 und F als Startpunkte der Transkription in allen vier untersuchten Zelltypen festgestellt. Zusätzlich wurde das Exon T2 bei den neuronalen Zellen, den mesenchymalen Stammzellen und den Chondrozyten als alternativer Promotor verwendet, nicht aber bei den osteoblastären Zellen. Die Exons E2, T1 und D blieben bei allen Zellen negativ. Bei den neuronalen und osteoblastären Zellen konnte bei den untranslatierten Exons F und E1 außerdem ein alternativer Spleißvorgang beobachtet werden, bei dem Exon E1 als Spleißdonor und Exon 2 als Spleißakzeptor fungierten. So wurden bei Nutzung von Exon F als Promotor Exons F-E1 an Exon 2 gespleißt, während bei Verwendung von Exon E1 nur dieses Exon an Exon 2 gebunden wurde.

Da mit der verwendeten Methodik keine Aussagen über die quantitative Verteilung der Transkription der einzelnen untranslatierten Exons in den untersuchten Zelltypen gemacht werden können, scheinen die Untersuchungsergebnisse zunächst ähnlich zu sein. Deutliche Unterschiede konnten bei Exon T2 beobachtet werden, das von osteoblastären Zellen nicht verwendet wurde. Außerdem bei dem alternativen Spleißvorgang, der bei Nutzung der Exons F und E1 auftrat und zu einer Proteinisoform des ER α führt, der die ligandenunabhängige Aktivierungsdomäne fehlt. Dieser alternative Spleißvorgang konnte nur bei osteoblastären und neuronalen Zellen beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen aber nicht gegen eine zellspezifische Nutzung der acht untranslatierten Exons und des Exons A. Vielmehr wurde auch schon in der Literatur die These aufgestellt, dass es Promotoren gibt, die von allen Zellen benutzt werden und für die basalen Spiegel der ER α mRNA verantwortlich sind, sowie andererseits gewebespezifische Promotoren, die je nach Bedarf beziehungsweise je nach Ausstattung mit Transkriptionsfaktoren der jeweiligen Zelle ER α exprimieren [Kos et al., 2001]. Für diese These sprechen auch Untersuchungsergebnisse von reproduktiven Geweben. Bei quantitativen Vergleichen der Nutzung der untranslatierten Exons (A), B, C, E und F bei MCF-7, Mammazellen, Ovarialzellen und Endometriumzellen konnte zwar eine Verwendung der Promotoren A, B, E und F in allen Zellen nachgewiesen werden, die anteilige Verwendung unterschied sich aber [Reid et al., 2002].

Um bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelltypen feststellen zu können, ob es einen oder mehrere Promotoren gibt, die hauptsächlich genutzt werden und ob sich dieser bei den Zellen unterscheidet, müsste man zusätzlich zu den bisher durchgeführten Untersuchungen noch quantitative Analysen durchführen. Um die Bedeutung der nachgewiesenen Promotoren für die Zellen zu klären, wäre auch ein Knockout einzelner Promotoren sinnvoll [Kos et al., 2001].

Bevor man sich aber Gedanken darüber macht, was das Ergebnis dieser zusätzlichen Untersuchungen sein könnte, sollte man sich mit dem Sinn der Verwendung multipler Promotoren beschäftigen: Eine Kontrolle der Expression des ER α ist angesichts der vielfältigen Wirkungen seines Liganden unerlässlich. Die richtige Anzahl des Östrogenrezeptorproteins muss zur richtigen Zeit am richtigen Ort sein. Eine derartige Kontrolle ist einerseits durch Nutzung multipler Promotoren möglich, deren anteilige Nutzung zellspezifisch und entwicklungspezifisch variiert. Andererseits wäre auch die Nutzung eines streng regulierten Promotors denkbar. In diesem Fall müsste es allerdings eine Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Transkriptionsfaktoren geben, die je nach Zelltyp, Dignität des Gewebes und Entwicklungsstadium reguliert werden müssten [Kos et al., 2001]. Eine derartige Kontrolle eines einzigen Promotors wäre viel komplizierter als die Verwendung mehrerer alternativer Transkriptionsstartpunkte und ist angesichts der Untersuchungsergebnisse anderer Studien als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

Bei quantitativen Analysen der anteiligen Verwendung der untranslatierten Exons in reproduktiven Organen, Leberzellen und Osteoblasten konnten folgende Beobachtungen

gemacht werden: Der Promotor A ist der wichtigste Promotor in Zellen mit hohen Expressionsspiegeln von ER α , also bei den Zellen der reproduktiven Organe. Seine Aktivität erhöht sich noch zusätzlich bei neoplastischer Umwandlung dieser Zellen, was auch für die These spricht, dass sich das Muster der Promotornutzung im Krankheitszustand ändert [Grandien et al., 1995]. In Leberzellen wurde hauptsächlich eine Verwendung des Promotors E2 gefunden und bei den Osteoblasten wird größtenteils der Promotor F genutzt, wobei 1/3 der mRNA-Isoformen durch alternatives Spleißen an Exon 2 entstehen [Reid et al., 2002]. Diese Analysen sprechen für eine zellspezifische Nutzung der Promotoren und legen die Vermutung nahe, dass dies auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellphänotypen gilt.

Wenn man nun davon ausgeht, dass eine kontrollierte Expression des ER α durch multiple Promotoren reguliert wird, gibt es einige denkbare Mechanismen über die eine derartige Regulation ausgeführt werden könnte. Zum einen kann die Expression über eine unterschiedliche Stärke der verschiedenen Promotoren beeinflusst werden, außerdem über eine variierende Ansprechbarkeit der Promotoren für Transkriptionsfaktoren. Weitere Mechanismen könnten eine variable Stabilität der jeweils produzierten mRNA, eine unterschiedliche Effizienz der Translation der verschiedenen mRNA-Isoformen [Reid et al., 2002] sowie Expressionsänderungen von Transkriptionsfaktoren und Ko-faktoren sein.

Eine derartige Regulation eines Gens durch zellspezifische Nutzung multipler Promotoren bietet mehrere Ansatzpunkte der Einflussnahme auf die Expression: 1) durch Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch an bestimmte Promotoren binden und 2) durch Herstellung von antisense Oligonukleotide, die spezifisch eine bestimmte mRNA-Variante binden, andere aber unbeeinflusst lassen [Flouriot et al., 1998].

Die genomische Organisation der Promotorregion des ER α

Jahr	E2	F	E1	T1	T2	D	C	B	A	Zitat
1991	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	+	Keaveney et al.
1995	+	NA	+	NA	NA	NA	+	NA	+	Grandien et al.
1997	+	+	+	NA	NA	NA	+	+	+	Thompson et al.
1998	+	+	+	NA	NA	+	+	+	+	Flouriot et al.

2002	NA	NA	NA	+	+	NA	NA	NA	NA	Brand et al.
2004	-	+	+	-	+	-	+	+	NA	diese Arbeit

Tabelle 14: Die genomische Organisation der Promotorregion des ER α . In der Tabelle sind die untranslatierten Exons des ER α Gens mit dem Jahr ihrer Entdeckung als alternativer Transkriptionsstartpunkt und ihren Erstbeschreibern dargestellt. Die Namen der Exons sind der von Kos et al. im Jahr 2001 vorgeschlagenen Nomenklatur angeglichen. Die Pluszeichen stehen für ein positives Ergebnisse der Analyse, die Minuszeichen für ein negatives Ergebnis und NA steht für nicht analysiert.

Zellspezifische Nutzung der untranslatierten Exons des ER α Gens

Zelllinie	E2	F	E1	T1	T2	D	C	B	A	Zitat
Osteoblasten	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	+	Grandien et al.
Osteoblasten	+	+	-	NA	NA	-	-	-	-	Flouriot et al.
Osteoblasten	+	+	-	NA	NA	NA	-	-	-	Denger et al.
Osteoblasten	-	+	+	-	-	-	+	+	NA	diese Arbeit
Gehirn	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	+	+	Österlund et al.
Gehirn	+	+	-	NA	NA	-	+	+	+	Flouriot et al.
Gehirn	-	+	+	-	+	-	+	+	NA	diese Arbeit
MSC	-	+	+	-	+	-	+	+	NA	diese Arbeit
Chondrozyten	-	+	+	-	+	-	+	+	NA	diese Arbeit
Mammazellen	+	+	-	NA	NA	+	+	+	+	Flouriot et al.
Mammazellen	+	+	-	NA	NA	NA	+	+	+	Denger et al.
Leber	+	+	-	NA	NA	+	+	+	+	Flouriot et al.
Leber	+	+	-	NA	NA	NA	-	-	+	Denger et al.
Ovarien	+	+	-	NA	NA	-	+	+	+	Flouriot et al.
Ovarien	+	+	-	NA	NA	NA	+	+	+	Denger et al.

Tabelle 15: Zellspezifische Nutzung der untranslatierten Exons des ER α Gens. In der Tabelle ist die bis heute beschriebene Nutzung der untranslatierten Exons bei verschiedenen Zelltypen im Vergleich dargestellt. Die Pluszeichen stehen für ein positives Ergebnis der Analysen, die Minuszeichen für ein negatives Ergebnis und NA für die fehlende Durchführung einer Analyse.

5.10 Die transaktivatorischen Funktionen des ER α

Der ER α gehört zur Superfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren [Mangelsdorf et al., 1995]. Wie auch die anderen Mitglieder dieser Superfamilie besitzt er unterschiedliche Funktionsdomänen. Eine dieser Funktionsdomänen ist die am N-terminalen Ende des ER α liegende A/B-Domäne, die eine ligandenunabhängige transaktivierende Funktion (AF-1) beinhaltet. Eine zweite ligandenabhängige transaktivierende Funktion (AF-2) ist am C-Terminus des Rezeptors in der Liganden-bindenden Domäne (LBD) lokalisiert [Mangelsdorf, Evans, 1995; Katzenellenbogen, Katzenellenbogen, 1996; Danielian et al., 1992; Lees et al., 1989; Tasset et al., 1990]. Diese beiden Funktionen beeinflussen gemeinsam mit Koregulatoren abhängig von Zelltyp und Promotor die Transkription von Zielgenen [Tzukerman et al., 1994; Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997; McInerney et al., 1998; Pham et al., 1992; Berry et al., 1990].

In Abwesenheit von Liganden pendeln die nukleären Rezeptoren assoziiert an unterschiedliche Chaperone zwischen Zytoplasma und Kern [Reid et al., 2002]. Nach Bindung eines Ligandens an eine hydrophobe Ausbuchtung in der Liganden-bindenden Domäne ändert der Rezeptor seine Konformation [Bourguet et al., 2000]. Im Falle eines agonistischen Ligandens legt sich die am weitesten C-terminal gelegene Helix 12 wie ein Deckel über die Ligandenbindungsstelle [Egea et al., 2000]. Diese Helix 12 ist eine verbreitete Struktur unter allen nukleären Rezeptoren und ihre Position spielt eine entscheidende Rolle für die transkriptionelle Aktivität der ligandenabhängigen transaktivatorischen Funktion [Renaud, Moras, 2000; Shiau et al., 2002; Kallen et al., 2002; Watkins et al., 2003; Bledsoe et al., 2002]. In ihrem aktivierten Zustand nach Agonistenbindung bildet sie gemeinsam mit anderen Strukturen der LBD die AF-2 und präsentiert eine hydrophobe Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren und Koregulatoren [Darimont et al., 1998; Gampe et al., 2000; Nolte et al., 1998; Shiau et al., 1998]. Koaktivatoren binden mittels eines leucinreichen Motivs an die hydrophobe Oberfläche des aktivierten Rezeptors. Interaktionen zwischen den Leucinen der Koaktivatoren und den hydrophoben Anteilen des Rezeptors stabilisieren diese Bindung [Wärnmark et al., 2003].

Während die Struktur der AF-2 Domäne viele Übereinstimmungen bei den nukleären Rezeptoren zeigt, ist die Struktur der AF-1 Domäne uneinheitlich und ungeordnet [Dahlman-Wright et al., 1995; Wärnmark et al., 2001; Bain et al., 2000; Bain et al.,

2001; Kumar et al., 1987]. Den N-Termini der nukleären Rezeptoren fehlt im inaktivierten Zustand eine sekundäre Faltung, sie besitzen aber die Fähigkeit über ihre hydrophoben Aminosäuren, eine α -Helix auszubilden [Dahlman-Wright, McEwan, 1996]. Diese Fähigkeit scheint eine wichtige Voraussetzung für die AF-1 vermittelte Genaktivierung zu sein, da Mutationen mit Verlust der hydrophoben Aminosäuren zu Beeinträchtigungen der transaktivatorischen Funktion führen. Die Bindung von Koaktivatoren an die AF-1 Domäne des Rezeptors führt zur Ausbildung beziehungsweise Festigung sekundärer Strukturen in der N-terminalen Funktion, dieser Mechanismus kann auch in transaktivierenden Regionen anderer Transkriptionsfaktoren beobachtet werden [Wärnmark et al., 2001; Kussie et al., 1996; McEwan et al., 1996; Shen et al., 1996; Uesugi et al., 1997; Radhakrishnan et al., 1997]. Die Bindung und Konformationsänderung könnte in zwei Schritten erfolgen. Zunächst würde der Rezeptor über seine sauren Reste in einer schnellen Assoziationsphase an den Koaktivator binden, dann könnte es in einer langsamen Bindungsphase durch hydrophobe Interaktionen zur Ausbildung einer adaptierten sekundären Konformation des N-Terminus kommen [Wärnmark et al., 2001]. Die an die AF-1 Domäne bindenden Koaktivatoren sind eine uneinheitliche Gruppe ohne strukturelle Homologien oder Sequenzübereinstimmungen. Ausschlaggebend für die aktivierende Funktion dieser Koregulatoren scheint die Beeinflussung der sekundären Struktur und somit des transaktivierenden Potentials der AF-1 Domäne zu sein.

Die Koregulatoren der beiden transaktivierenden Funktionen des Östrogenrezeptors sind häufig Untereinheiten größerer Multiproteinkomplexe, die Funktionen wie Chromatinremodellierung, enzymatische Modifikation von Histonen oder Modulation des Präinitiationskomplexes durch Interaktionen mit RNA Polymerase II und Transkriptionsfaktoren ausüben [Wärnmark et al., 2003]. Es gibt Koregulatoren, die nur mit der AF-1 Domäne interagieren, andere, die nur die AF-2 Domäne beeinflussen und Koregulatoren, die in Wechselwirkung mit beiden transaktivierenden Funktionen stehen [Glass, Rosenfeld, 2000; McKenna et al., 1999]. Abhängig vom Zielgen und dem Zelltyp können Koregulatoren als Koaktivatoren oder Korepressoren agieren, sie besitzen keine intrinsisch festgelegte Funktion [Rogatsky et al., 2001; Subramaniam et al., 1999]. Auch die Verteilungsmuster der Koregulatoren sind zellspezifisch und unterscheiden sich.

Eine weitere Möglichkeit der zellspezifischen Regulation der Transkription von Zielgenen bietet die unterschiedliche Dominanz der beiden transaktivierenden Funktionen im jeweiligen Promotor- und Zelltypkontext. In den HeLa Zellen ist beispielsweise die AF-2 die dominierende transaktivierende Funktion, während die Transkription in der Leberzelllinie HepG2 hauptsächlich durch die AF-1 reguliert wird [Berry et al., 1990; Tzukerman et al., 1994; Norris et al., 1997]. In anderen Zelllinien wie den Osteoblasten wird die Transkriptionsrate durch beide Funktionen beeinflusst, wobei ein Synergismus von AF-1 und AF-2 zur maximalen transkriptionellen Aktivität führt.

5.11 Die 46 kDa-Variante des ER α

Der ER α vermittelt eine Vielzahl östrogenen Wirkungen in unterschiedlichen Zielzellen. Um eine Expression des Rezeptors in richtiger Anzahl, zur richtigen Zeit und am richtigen Ort zu gewährleisten, sind Kontrollen der Transkription und der Translation nötig. Eine Kontrollmöglichkeit ist die zellspezifische Expression unterschiedlicher mRNA-Isoformen des Rezeptors. Diese mRNA-Isoformen werden beim ER α unter anderem durch Nutzung multipler Promotoren und durch alternatives Spleißen generiert. Bis jetzt sind neun in der 5'-flankierenden Region des humanen ER α gelegene Promotoren (E2, F, E1, T1, T2, D, C, B, (A)) bekannt. Die meisten mRNA-Isoformen, die durch Nutzung dieser acht alternativen Promotoren entstehen, unterscheiden sich nur in ihrer 5'-untranslatierten Region, die oberhalb des Translationsstartpunktes liegt. Diese Isoformen kodieren alle für das gleiche ER α Protein mit einer Größe von 66 kDa.

In dieser Arbeit wurden in der Gelelektrophorese sowohl bei den Osteoblasten als auch bei den Neuroblastomzellen bei F-Isoformen und E1-Isoformen kleinere PCR-Produktvarianten gefunden. Zunächst wurden diese kleineren, nicht der erwarteten Größe entsprechenden PCR-Produkte für Abbruchprodukte durch Verunreinigung gehalten. Die Sequenzierungen der F- und E1-Isoformen in diesen Zelllinien ergaben jedoch jeweils zwei spezifische Produkte. Bei dem größeren Produkt wurde das untranslatierte Exon wie erwartet an die Spleißakzeptorstelle an Position in Exon 1 gebunden, im Falle des kleineren Produkts wurde Exon 1 vollkommen übersprungen und Position +685 (in der vorliegenden Arbeit entspricht dies Position +1811) in Exon 2 diente als Spleißakzeptor. Sowohl bei Verwendung von Exon F als auch bei Verwendung von Exon E1 als Transkriptionsstartpunkt fungierte Exon E1 als Spleißdonor.

In den auf den Spleißakzeptor des Exons 2 folgenden Regionen liegen zwei ATG Kodons, eines an Position +752 (in der vorliegenden Arbeit +1878) und ein anderes an Position + 758 (in der vorliegenden Arbeit +1884) [Denger et al., 2001]. Beide ATGs sind von einer für die Translationsinitiation günstigen „Kozac“ Sequenz umgeben [Kozak, 1989]. Eine von diesen alternativen Startpunkten ausgehende Translation resultiert in der Expression eines verkürzten ER α Proteins. Diesem Rezeptorprotein fehlen die am N-Terminus gelegenen ersten 173 Aminosäuren und somit die A/B-Domäne [Flouriot et al., 2000].

Die mRNA-Isoformen des ER α mit verändertem N-Terminus wurden auch in anderen Spezies gefunden. In der Leber und dem Eileiter des Huhnes wurde beispielsweise zusätzlich zu dem bekannten Rezeptorprotein mit einer Größe von 66 kDa eine verkürzte Variante mit einem Molekulargewicht von 61 kDa gefunden [Griffin et al., 1999]. Die beiden Östrogenrezeptorisoformen des Huhnes modulieren die zell- und promotorspezifische Expression von östrogenen Zielgenen in unterschiedlicher Weise. Während der Rezeptor mit einer Größe von 66 kDa die Transkriptionsrate ausschließlich in Abhängigkeit von Östrogenen kontrolliert, ist der verkürzte Rezeptor in der Lage, auch in Abwesenheit des Ligandens die Expression von Zielgenen zu beeinflussen.

Für die am N-Terminus verkürzte Transkriptisofom des Huhnes wurde die Aminosäure Methionin als Translationsstartpunkt ausgemacht. Dieser alternative Startpunkt wurde auch bei anderen eierlegenden Spezies gefunden, nicht aber bei Säugetieren [Griffin et al., 1999].

Von der in der vorliegenden Arbeit in Osteoblasten und Neuroblastomzellen gefundenen verkürzten Rezeptorisoform des humanen ER α wurde schon in anderen Studien berichtet. Dabei scheint eine Entstehung dieser Variante nicht nur auf der Transkriptionsebene durch alternatives Spleißen möglich zu sein, sondern auch in geringeren Mengen auf der Translationsebene durch internalen Ribosomeneintritt [Barraille et al., 1999].

Die Expression der durch alternatives Spleißen entstandenen verkürzten mRNA-Isoform wurde von Flouriot und seiner Arbeitsgruppe bei Untersuchungen an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 sowie Zellen aus der Mammadrüse, dem Endometrium, den Ovarien, der Hypophyse, der Leber, dem Muskel, der Lunge, der Niere und der Nebenniere in allen untersuchten Zelllinien, ausgenommen den Hypophysenzellen, festgestellt. Zur Untersuchung der Transkriptisofomformen wurde wie in der vorliegenden Ar-

beit mit zwei hintereinander durchgeführten PCRs gearbeitet. Dabei lagen die beiden antisense Primer in Exon 2, während die sense Primer aus den jeweils untersuchten untranslatierten Exons stammten. Um Aussagen über die quantitative Verteilung der Isoformen machen zu können, wurden zusätzlich Untersuchungen mit der S1-Nuklease Methodik durchgeführt. Dabei wurden nur geringe Mengen des 46 kDa Rezeptorproteins in reproduktiven Geweben gefunden (10 %), während die Expression der verkürzten Rezeptorform in nichtreproduktiven Organen im Vergleich mit dem 66 kDa Rezeptor etwa 20-50 % des Gesamttranskriptes ausmacht. Diese Untersuchungsergebnisse werden von anderen Studien bestätigt. In einer Studie wurde beispielsweise zunächst die Expression der 46 kDa Rezeptorisoform in osteoblastären Zellen und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nachgewiesen und anschließend die quantitativen Verhältnisse der beiden Rezeptoren in den Zelllinien untersucht. Mit Hilfe von S1-Nuklease Analysen konnten in der MCF-7 Zelllinie nur geringe Mengen der an Exon 2 gespleißten Transkriptvariante gefunden werden. Im Gegensatz dazu machte diese Variante ungefähr 50 % der in den Osteoblasten detektierten mRNA aus [Denger et al., 2001]. In der vorliegenden Arbeit können aufgrund der verwendeten Methodik keine genauen Angaben über die quantitative Verteilung der unterschiedlichen mRNA-Isoformen gemacht werden, doch sprechen sowohl die ausgeprägten Banden in der Gelelektrophorese als auch die Ergebnisse der Sequenzierung für eine quantitative Bedeutung der verkürzten Rezeptorvariante in Neuroblastomzellen und Osteoblasten. Da es sich bei beiden Zelllinien um nicht reproduktive Gewebe handelt, würden diese Beobachtungen mit den Untersuchungsergebnissen der bisher veröffentlichten Studien übereinstimmen.

Sowohl in der Arbeitsgruppe von Flouriot (2000) als auch in der von Denger (2001) wurde die Fähigkeit der 46 kDa ER α Isoform, Homo- oder Heterodimere auszubilden, in *in vitro* Studien untersucht. Dabei wurde die Bildung von Homodimeren sowie von Heterodimeren mit der 66 kDa Rezeptorform und mit ER β nachgewiesen. Sowohl die Homo- als auch die Heterodimere sind funktionell aktiv und binden an ERE, wobei Homodimere der verkürzten Rezeptorform eine höhere Affinität für die hormonrespon-siven Elemente der Zielgene zeigen.

Der 66 kDa ER α besitzt zwei transaktivierende Funktionen. Die ligandenunabhängige ist in der A/B-Domäne, die ligandenabhängige in der LBD-Domäne lokalisiert. Da die 46 kDa Rezeptorform ihre A/B-Domäne durch Spleißvorgänge verloren hat, kann sie

Transkription von Zielgenen nur über die verbleibende ligandenabhängige transaktivierende Funktion beeinflussen. In einem Zell- und Promotorkontext, in dem die ligandenabhängige AF-2 dominiert, kann der 46 kDa ER α synergistisch mit dem 66 kDa ER α östrogenabhängig ERE stimulieren. In einem Kontext, in dem die Bedeutung der AF-1 Domäne überwiegt, zeigt der 46 kDa ER α nicht nur wie erwartet kein stimulatives Potential, die Expression der verkürzten Variante führt sogar zur Inhibition des 66 kDa ER α . Die Ursache für diesen inhibitorischen Effekt ist noch nicht geklärt. Neben einer Verdrängung des 66kDa ER α durch höhere Affinität des 46 kDa ER α für ERE könnten Unterschiede in den Wechselwirkungen mit Koregulatoren eine Rolle spielen [Flouriot et al., 2000].

Da der 46 kDa ER α funktionell aktiv ist und regulativ in die Transkription von Zielgenen eingreifen kann, müssen die Beobachtungen von organischen Veränderungen und Verhaltensabweichungen an ER α KO Mäusen neu bewertet werden. In einigen Mausmodellen wurde die Unterbrechung des ER α Gens der Maus durch Einfügung eines 1,8-kb langen Ausschnitts eines NEO Gens in Exon 2 erreicht [Couse et al., 1995]. Das Exon 2 der Maus korrespondiert mit dem Exon 1 des Menschen und kann somit durch alternative Spleißvorgänge übersprungen werden [Denger et al., 2001]. Diese Spleißvorgänge resultieren in der Translation des 46 kDa ER α . Diese Rezeptorvariante wird folglich auch bei den oben genannten Knockout Mäusen exprimiert. In diesen Fällen könnte die Expression der verkürzten Variante zu einer Kompensation des Verlusts des 66 kDa ER α führen. Dieser Mechanismus scheint besonders in nichtreproduktiven Organen eine entscheidende Rolle zu spielen, da die 46 kDa Rezeptorvariante in diesen Organen bis zu 50 % des Gesamttranskripts ausmacht. Die Veränderungen in diesen Geweben könnten demnach deutlich ausgeprägter sein als bisher angenommen.

5.11.1 Klinische Bedeutungen der 46 kDa Rezeptorisoform

Die Entdeckung der am N-Terminus verkürzten 46 kDa Östrogenrezeptorisoform und ihrer zell- und promotorspezifischen regulatorischen Einflüsse auf die 66 kDa Rezeptorform bietet eine Erklärungsmöglichkeit der unterschiedlichen zellspezifischen Effekte der SERMs (selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren). Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren wie Tamoxifen und Raloxifen haben gemischt agonistisch-antagonistische

Wirkungen auf den Östrogenrezeptor und zeichnen sich durch ihre hohe Rezeptoraffinität aus. Ihre agonistischen Wirkungen entwickeln sie über die AF-1 des Östrogenrezeptors, während sie die AF-2 nicht aktivieren können [Berry et al., 1990]. Diese Eigenschaft der SERMs spiegelt sich auch in ihren Wirkungen auf die beiden Rezeptorisoformen wider. Während die SERMs eine Transaktivierung der 66 kDa ER α Rezeptorisoform hervorrufen können, haben sie keine Wirkung auf die 46 kDa ER α Rezeptorisoform, die keine AF-1 Domäne besitzt [Denger et al., 2001]. Zusätzlich ist der inhibitorische Effekt, den die verkürzte Rezeptorform in Anwesenheit von Östrogenen auf den Rezeptor mit voller Länge ausübt, bei einer Transaktivierung durch SERMs abgeschwächt. Dieser Unterschied in der Wirkungsweise von Östrogenen und SERMs scheint eine wichtige Voraussetzung für den antiproliferativen Effekt der selektiven Östrogenrezeptormodulatoren auf Mammakarzinomzellen zu sein.

In Untersuchungen an der Mammakarzinomzelllinie MCF7 wurde eine Veränderung des Verhältnisses der beiden Rezeptorisoformen in Abhängigkeit vom Zellwachstumsstatus beobachtet. Während der Anteil der 66 kDa ER α Rezeptorisoform in langsam proliferierenden Zellen gegenüber der verkürzten Variante deutlich überwiegt, nimmt seine Menge bei schnell proliferierenden Zellen um das drei- bis vierfache ab. Die Expression der 46 kDa ER α Rezeptorisoform unterliegt hingegen keinen quantitativen Veränderungen während der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus [Flouriot et al., 2000]. Ähnliche Veränderungen des Verteilungsverhältnisses wurden unter Östrogen substitution beobachtet, die einen mitogenen Effekt auf die MCF7-Zellen ausübt. In dieser Zelllinie scheint eine Reduktion der 66kDa ER α Rezeptorisoform und somit der ligandenunabhängigen transaktivierenden Funktion (AF-1) eine Voraussetzung für den Übergang in eine proliferative Phase des Zellzyklus zu sein [Flouriot et al., 2000]. Umgekehrt könnte die antiproliferative Wirkung der SERMs über die Aktivierung dieser AF-1 Domäne vermittelt werden. Der Vorteil der SERMs gegenüber Östrogenen ist die deutlich geringer ausgeprägte Inhibition dieser Aktivierung durch die 46 kDa ER α Rezeptorisoform [Denger et al., 2001].

Ein durch selektive Östrogenmodulatoren und somit durch die AF-1 Domäne hervorgerufener antiproliferativer Effekt konnte auch bei den Osteoklasten festgestellt werden. In diesen Zellen kommt es unter SERM-Substitution zu einer TGF- β vermittelten Apoptose [Hughes et al., 1996].

Entgegengesetzte Auswirkungen der quantitativen Verhältnisse der beiden Rezeptorisoformen auf die Proliferation konnten beim Gegenspieler der Osteoklasten, den Osteoblasten, beobachtet werden. In dieser Zelllinie kommt es unter Substitution geringer Mengen der 46 kDa ER α Rezeptorisoform zu einer Steigerung der Proliferation, während höhere Konzentrationen des verkürzten Rezeptors zu einer Abnahme der Proliferation führen. Diese Beobachtungen könnten für einen proliferativen Effekt der AF-1 Aktivierung in dieser Zelllinie sprechen [Denger et al., 2001].

Diese Beobachtungen einer zellspezifischen Regulation der Proliferationsrate durch die AF-1 Domäne und die quantitativen Verhältnisse der beiden Rezeptorisoformen könnte gemeinsam mit zellspezifisch exprimierten Koregulatormustern ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen zellspezifischen agonistischen und antagonistischen Wirkungen der selektiven Östrogenrezeptormodulatoren sein.

5.12 Die Expression des ER α während der osteogenen Differenzierung

Der Knochenabbau und die verminderte Knochenmineralisierung in der Postmenopause sind Folge einer negativen Skelettbilanz durch Überwiegen der Knochenresorption gegenüber der Knochenneubildung [Turner et al., 1994; Heaney et al., 1978]. Eine Östrogensubstitution ermöglicht die Wiederherstellung der Balance dieser beiden Vorgänge. Ursache dieser östrogenen Wirkung schien zunächst hauptsächlich eine Inhibition der knochenabbauenden Osteoklasten zu sein [Okazaki et al., 2002]. Seit in einigen Studien eine Expression des ER α in osteoblastären Zellen nachgewiesen werden konnte, wird auch eine Beeinflussung von Entwicklung und Funktion dieser Zelllinie durch Östrogene vermutet [Zhou et al., 2001]. Bis heute werden sowohl die Expression des ER α während der osteoblastären Entwicklung als auch die Einflussnahme von Östrogenen auf einzelne Differenzierungsschritte kontrovers diskutiert.

In einigen Studien konnte eine Expression des ER α während der gesamten osteoblastären Differenzierung nachgewiesen werden. Diese Expression wurde sowohl unter Östrogensubstitution als auch ohne Hormongabe beobachtet [Qu et al., 1998]. In anderen Studien wurde eine Zunahme der Rezeptorexpression während der Differenzierung mit den höchsten mRNA- und Proteinwerten in differenzierten Osteoblasten festgestellt [Arts et al., 1997; Bodine et al., 1998].

Variable Studien wurden auch bezüglich der Einflussnahme von Östrogenen auf die verschiedenen Differenzierungsschritte der Osteoblasten veröffentlicht. In einigen Studien konnte eine Zunahme der osteogenen Marker wie der Kollagenexpression und der Aktivität der alkalischen Phosphatase unter Östrogeneinfluss festgestellt werden [Ernst et al., 1988; Scheven et al., 1992]. Aber auch in den Studien, die einen positiven Effekt der Östrogensubstitution auf die osteoblastäre Proliferation und Differenzierung nachweisen konnten, gab es eine Variationsbreite bezüglich des Zeitpunkts der Einflussnahme. Während die einen Studien östrogene Wirkungen hauptsächlich in den ersten sechs Tagen der osteogenen Differenzierung feststellten [Qu et al., 1998; Okazaki et al., 2002], wiesen andere Studien eine ausgeprägtere Regulation von osteogenen Markergenen in späteren Differenzierungsschritten nach [Waters et al., 2001] und dritte beobachteten eine Zunahme der alkalischen Phosphatase während der gesamten Differenzierung [Robinson et al., 1997].

Andere Arbeiten stellten wiederum eine Abnahme osteogener Marker unter Östrogensubstitution fest und vermuteten aus diesem Grund eine inhibitorische Wirkung des Hormons auf die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten [Watts et al., 1989].

Aber auch die Möglichkeit einer fehlenden Einflussnahme des Hormons auf die osteogene Proliferation und Differenzierung wurde in Studien an Osteoblasten nachgewiesen [Keeting et al., 1991].

Mögliche Gründe für diese divergenten Resultate unterschiedlicher Studien an Osteoblasten werden diskutiert. Ursächlich könnte beispielsweise eine Heterogenität der Zelltypen sein [Robinson et al., 1997]. In Studien, in denen Osteosarkomzellen als Modellsystem dienten, wurden variable Expressionsspiegel des ER α sowie unterschiedliche Differenzierungsphasen der Zelllinien gefunden [Qu et al., 1998]. Aus diesem Grund kann es in diesen Modellsystemen zu unterschiedlichen, nicht vergleichbaren Ergebnissen kommen. Ein Problem der Modellsysteme mit neonatalen oder fetalen Osteoblasten ist die Unsicherheit der Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten mit denen, die bei osteoblastären Zelllinien Erwachsener erhoben werden [Turner et al., 1994]. Da einige Studien osteoblastäre Zelllinien von Tieren als Modellsystem verwendeten, könnten weitere Gründe für die kontroversen Ergebnisse speziesspezifische Unterschiede der östrogenen Wirkungen sein [Robinson et al., 1997]. Es wurde beispielsweise festgestellt, dass

eine Beeinflussung der Osteogenese durch Östrogensubstitution bei einer Ratte erheblich geringere Konzentrationen an Östrogenen benötigt als bei einer Maus und somit unterschiedliche Mechanismen der Östrogenwirkung zugrunde liegen könnten [Turner, 1999]. Ein generelles Problem der Untersuchung der Östrogenwirkungen an Osteoblasten sind die sehr geringen und variablen Expressionslevel des ER α in dieser Zelllinie. Problematisch ist außerdem die Bewertung von Ergebnissen aus *in vitro* Studien, da die geringen Wirkungen von Östrogenen auf Osteoblasten *in vitro* keinesfalls die Einflussnahme von Östrogenen auf Osteoblasten *in vivo* widerspiegeln [Takano-Yamamoto, Rodan, 1990].

Ebenso uneinheitlich wie die in der Literatur beschriebenen Resultate waren auch die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen. Als Modellsystem dienten Primärkulturen pluripotenter mesenchymaler Stammzellen von drei verschiedenen Spendern, die durch Substitution von β -Glycerophosphat und Ascorbat zur osteogenen Differenzierung angeregt wurden. Die einzelnen Differenzierungsschritte wurden durch Kontrollen der osteogenen Marker überprüft. Während der vierwöchigen Differenzierung wurde zur Untersuchung der Expression des ER α wöchentlich eine RNA-Isolierung durchgeführt. Mit der RT-PCR Methodik sollte die ER α mRNA in den unterschiedlichen Differenzierungsphasen nachgewiesen werden. Die verwendeten Primerpaare stammten dabei einmal aus der DNA-bindenden Domäne und in einer anderen Versuchsanordnung aus den Exons 1 und 2. Bei Untersuchung der Differenzierungsschritte konnten beide in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster des ER α in den unterschiedlichen Versuchsanordnungen beobachtet werden. Sowohl eine Zunahme der Rezeptorexpressionsspiegel während der Differenzierung als auch eine etwa gleich bleibende Menge der ER α mRNA in allen Entwicklungsschritten waren in der Gelelektrophorese sichtbar. Ursachen dieser divergenten Ergebnisse könnten neben Unterschieden, die in den drei Primärkulturen der Stammzellen selbst begründet sind, wie Differenzen in der quantitativen Genexpression während der Differenzierung, auch Fehler der Methodik, wie Kontamination und fehlerhaftes Binden der Primer sein. Aufgrund der divergenten Ergebnisse in dieser Versuchsreihe können keine Aussagen über ein wahrscheinliches Verteilungsmuster des ER α während der osteogenen Differenzierung gemacht werden.

5.13 Die Expression des ER α während der adipogenen Differenzierung

Bei allen Zuständen, die mit einer verminderten Knochenneubildung einhergehen, kann eine Zunahme von Fettgewebe im Knochenmark beobachtet werden [Nuttall et al., 1998]. Hierzu zählen die Immobilisation [Minaire et al., 1974], die Behandlung mit Glukokortikoiden [Wang et al., 1977] und die Ovariectomie [Wronski et al., 1986; Martin et al., 1990]. Da sowohl Osteoblasten als auch Adipozyten von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks abstammen, könnte eine Ursache dieser Veränderungen eine Imbalance der Differenzierung dieser Vorläuferzellen in die beiden Zellphänotypen sein [Nuttall et al., 1998]. Die Vermutung, dass eine hohe Plastizität zwischen der Osteo- und Adipogenese besteht, wird auch durch Beobachtungen von Transdifferenzierungen dieser beiden Zellphänotypen unterstützt. Beispielsweise können Adipozyten, die aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark kultiviert wurden, zu einer proliferativen Phase zurückkehren und sich osteogen differenzieren [Beresford et al., 1992]. Andererseits wurde ebenfalls beobachtet, dass differenzierte Osteoblasten, die Osteocalcin exprimierten, eine adipogene Differenzierung durchliefen [Nuttall et al., 1998]. Eine wichtige Rolle bei der sich ausschließenden Partnerschaft von Adipo- und Osteogenese könnten auch Zytokine spielen. So haben einige Zytokine, die zu einer Inhibition der Adipogenese führen wie beispielsweise TGF-beta, auch Einfluss auf die Osteogenese [Meunier et al., 1971; Delikat et al., 1993]. Auch die Hypothese der Regulation der Transdifferenzierung durch Zytokine wurde bereits geäußert. Es ist möglich, dass komplett funktionelle Adipozyten einige Adipozytokine sezernieren, die zu einem osteogenen Phänotyp führen [Nuttall, Gimble, 2004].

Die Tatsache, dass sowohl der Östrogenmangel in der Postmenopause, als auch die Ovariectomie zu einem Verlust von trabekulärem Knochen und zu einer Zunahme von Fettgewebe im Knochenmark führen, legt die Vermutung nahe, dass Östrogene eine Bedeutung für die entgegengesetzte Partnerschaft von Osteo- und Adipogenese haben. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden schon in früheren Studien Untersuchungen an Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen unter Östrogensubstitution durchgeführt [Okazaki et al., 2002]. Hierbei konnte eine Förderung der Osteogenese und eine Inhibition der Adipogenese beobachtet werden. Während die frühe Adipogenese unbeeinflusst blieb, kam es in späteren Differenzierungsschritten zu einer signifikanten Abnahme der adipogenen Marker. Die Inhibition der Adipogenese durch Östrogene

erfolgte schon bei niedrigen Expressionsspiegeln der ER α mRNA und war durch Rezeptorblocker antagonisierbar, was für eine Vermittlung dieser östrogenen Wirkung durch den ER α spricht [Okazaki et al., 2002]. Für die Vermutung, dass für die Inhibition der Adipogenese ER α bedeutsam sein könnte, sprechen auch Beobachtungen an ER α KO Mäusen. Bei diesen Mäusen kam es zu einer signifikanten Zunahme von weißem Fettgewebe [Heine et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der ER α mRNA während der adipogenen Differenzierung überprüft. Als Modellsystem für diese Versuchsreihe dienten wie bei der osteogenen Differenzierung Primärkulturen pluripotenter mesenchymaler Stammzellen von drei verschiedenen Spendern, die durch Kultivierung in mit FBS, Dexamethason, Isobutylmethylxanthin, Insulin und Indomethacin versetztem DMEM zur adipogenen Differenzierung angeregt wurden. Während der dreiwöchigen Differenzierung wurde wöchentlich eine RNA-Isolierung durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde mit der PCR Methodik unter Verwendung zwei unterschiedlicher Primerpaare auf eine ER α Expression überprüft. Die Primerpaare stammten in einer Versuchsanordnung aus der DNA-bindenden Domäne, in der anderen aus den Exons 1 und 2. In beiden Versuchsanordnungen konnte eine Expression des ER α in allen Entwicklungsschritten der adipogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Dieses Untersuchungsergebnis stimmt mit der Studie von Heim überein, in der nachgewiesen werden konnte, dass alle Östrogenrezeptoren außer ER α während der Adipogenese herunterreguliert werden [Heim et al., 2003]. Ob diese dauerhafte Expression eventuell eine Bedeutung für die Transdifferenzierung zwischen Adipozyten und Osteoblasten auch in späten Differenzierungsstadien der Adipogenese von Bedeutung ist, muss noch durch weitere Untersuchungen überprüft werden. Generell bedürfen die Interaktionen zwischen Östrogenen und Adipozyten und die Bedeutung von Östrogenen für die sich ausschließende Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in Osteoblasten oder Adipozyten im Knochenmark noch einer weitergehenden Abklärung [Heim et al., 2003].

6 Zusammenfassung

Östrogene spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse sowohl im reproduktiven als auch im nicht reproduktiven Bereich des menschlichen Körpers. Viele Wirkungen der Östrogene werden über Östrogenrezeptoren vermittelt. Um zu gewährleisten, dass die richtige Menge des Rezeptors zur richtigen Zeit am richtigen Ort ist, ist eine Kontrolle der Expression unabdingbar. Die Ergebnisse vorhergehender Studien legen die Vermutung nahe, dass eine derartige Kontrolle beim ER α über die Nutzung multipler Promotoren ausgeführt wird. Durch Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren ermöglicht dieses System eine zell-, entwicklungsstadien- und dignitätsspezifische Expression des Rezeptors.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Nutzung der 8 untranslatierten Exons und des Exons A des ER α Gens als alternative Transkriptionsstartpunkte bei osteoblastären Zellen, neuronalen Zellen, mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten mittels der RT-PCR Methodik und anschließender Sequenzierung untersucht. So konnte bei allen vier untersuchten Zelltypen eine Nutzung der Exons F, E1, C, B und (A) als alternative Promotoren nachgewiesen werden. Bei neuronalen Zellen, Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen konnte zusätzlich eine Nutzung des Promotors T2 beobachtet werden. Bei osteoblastären und neuronalen Zellen wurde bei Nutzung der Promotoren F und E1 außerdem ein alternativer Spleißvorgang festgestellt. Bei diesem Spleißvorgang dient Exon E1 als Spleißdonor und Exon 2 als Spleißakzeptor. Die dadurch entstehenden mRNA-Isoformen generieren einen um die A/B-Domäne verkürzten ER α , welcher jedoch funktionell aktiv ist.

Die Nutzung der multiplen Promotoren des ER α Gens bei mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen. Zusätzlich zu den bisher in der Literatur beschriebenen Exons konnte außerdem erstmalig eine Verwendung der Promotoren E1, B und (A) als alternative Transkriptionsstartpunkte bei osteoblastären Zellen nachgewiesen werden, sowie bei den neuronalen Zellen von Exons E1 und T2. Die Nutzung der Exons E1 und T2 als Transkriptionsstartpunkte konnte in der vorliegenden Arbeit generell zum ersten Mal beobachtet werden. Diese beiden untranslatierten Exons sind bisher nur als zweite zwischengeschaltete Exons beschrieben worden.

Die Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen somit eine Nutzung von alternativen Promotoren des ER α Gens in allen untersuchten Zellen.

Da mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methodik keine Aussagen über die quantitative Verteilung der Nutzung der untranslatierten Exons in den untersuchten Zellen gemacht werden können, kann die Bedeutung der einzelnen untranslatierten Exons in den Zellen noch nicht gedeutet werden. Neben einer quantitativen Analyse der Nutzungsmuster in den verschiedenen Zellen wäre auch der Versuch eines partiellen Knockouts einzelner alternativer Promotoren ein Ansatzpunkt für folgende Arbeiten, um die Bedeutung der einzelnen untranslatierten Exons in den Zellen zu erleuchten.

Obwohl quantitative Analysen der Nutzung der einzelnen Exons bei den untersuchten Zellen noch ausstehen, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass eine Regulation der Expression von ER α in den vier Zelltypen über die Nutzung von multiplen Promotoren erfolgen könnte.

Eine derartige Regulation des ER α Gens bietet mehrere Ansatzpunkte der Einflussnahme auf die Expression. Beispielsweise durch Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch an bestimmte Promotoren binden oder durch Herstellung von antisense Oligonukleotiden, welche spezifisch eine bestimmte mRNA-Variante binden, andere hingegen unbeeinflusst lassen.

Auch die in der vorliegenden Arbeit erstmalig vorgenommene Untersuchung der untranslatierten Exons des ER α Gens bei mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten bietet Ansatzpunkte für weiterführende Fragestellungen. Hierzu zählen beispielsweise die Fragen nach der Beeinflussbarkeit der Differenzierung der pluripotenten mesenchymalen Stammzellen durch Veränderungen an den alternativen Promotoren und nach der Nutzung der untranslatierten Exons während der chondrogenen Differenzierung. Diese neuen offenen Fragen führen zu Aufgabenstellungen weitergehender Arbeiten.

7 Abkürzungsverzeichnis

AF-1	ligandenunabhängige Funktion	transaktivierende
AF-2	Ligandenabhängige Funktion	transaktivierende
AP-1-Element	Transkriptionsfaktor	
AP 2	Adipozytenprotein 2	
c-FOS	Protoonkogen	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
DNADOMforward	In der DNA-Domäne liegender sense Primer	
DNADOMreverse	In der DNA-Domäne liegender antisense Primer	
dNTP	Desoxynucleotid Mischung	
DRIP/ARC/TRAP Komplexe	Mediatorkomplex	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
EF1 α	Elongation Factor 1alpha, eine Komponente der Translationsmaschinerie	
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	
ER α	Östrogenrezeptor Alpha	
ER β	Östrogenrezeptor Beta	
ERE	Östrogen responsive Elemente	
FCS 10%	10% gestripptes fötales Rinderserum	
HDL-Cholesterin	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin	
hFOB	Humane fetale Osteoblasten	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	
HSP	heat-shock Proteine	
IGF-1	Insulin-like growth factor	

KOMaus	Knockout Maus - Mausstämme mit funktioneller Inaktivierung jeweils eines Östrogenrezeptors
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDL-Cholesterin	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
LH	luteinisierende Hormon
LPL	Lipoproteinlipase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymalen Stammzellen
NO	Stickoxid
N-Terminus	Amino-Terminus
p160 Familie	Transkriptions-Koaktivatoren, die mit Steroidhormonrezeptoren interagieren
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA, PKC α , PKC δ	Proteinkinasen
PPAR γ 2	Peroxisom proliferatoraktivierender Rezeptor gamma 2
Ser	Serin
SERM	Selektive Östrogenrezeptor Modulatoren
SP1 Proteine	GC-box Binding Protein
SRC-1	Koaktivator
SV	Simian Virus
TGF α	Transforming Growth Factor α
5'-UTR	5'-untranslatierte Region

8 Literaturverzeichnis

- **Arts J.**, Kuiper G. G., Janssen J. M., Gustafsson J. A., Lowik C. W., Pols H. A., van Leeuwen J. P. (1997). Differential expression of estrogen receptor alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology*, 138, 5067-5070.
- **Auchus R.J.**, Fuqua S.A.W. (1994). The oestrogen receptor. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism: Hormones, Enzymes and Receptors*, Vol. 8. Baillière Tindall, London, UK, 433–449.
- **Ayoubi T. A. Y.**, Van de Ven W. J. M. (1996). Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.*, 10, 453-460.
- **Bain D. L.**, Franden M. A., McManaman J. L., Takimoto G. S., Horwitz K. B. (2000). The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural analysis and the influence of the DNA binding domain. *J Biol Chem*, 275, 7313–7320.
- **Bain D.**, Franden M., Horwitz K. (2001). The N-terminal region of human progesterone B-receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors. *J Biol Chem*, 276, 23825–23831.
- **Barraille P.**, Chinestra P., Bayard F., Faye J. C. (1999). Alternative initiation of translation accounts for a 67/45 kDa dimorphism of the human estrogen receptor ERalpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 257, 84-88.
- **Bayard F.**, Clamens S., Meggetto F., Blaes N., Delsol G., Faye J. C. (1995). Estrogen synthesis, estrogen metabolism and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cell in culture. *Endocrinology*, 136, 1523–1529
- **Beato M.** (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56, 335–344.
- **Beekman J. M.**, Allan G. F., Tsai S. Y., Tsai M.J., O'Malley B. W. (1993). Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol. Endocrinol.*, 7, 1266-1272.
- **Beresford J. N.**, Bennett J. H., Devlin C., Leboy P. S., Owen M. E. (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.*, 102, 341-351.

- **Berry M.**, Metzger D., Chambon P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the celltype and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, 9, 2811–2818.
- **Bledsoe R. K.**, Montana V. G., Stanley T. B., Delves C. J., Apolito C. J., McKee D. D., Conslor T. G., Parks D. J., Stewart E. L., Willson T. M., Lambert M. H., Moore J. T., Pearce K. H., Xu H. E. (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*, 110, 93–105.
- **Bodine P. V.**, Henderson R. A., Green J., Aronow M., Owen T., Stein G. S., Lian J. B., Komm B. S. (1998). Estrogen receptor-alpha is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness of gene expression. *Endocrinology*, 139, 2048-2057.
- **Bourguet W.**, Germain P., Gronemeyer H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 381–388.
- **Bunone G.**, Briand P. A., Miksicek R. J., Picard D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.*, 15, 2174-2183.
- **Brand H.**, Kos M., Denger S., Flouriot G., Gromoll J., Gannon F., Reid G. (2002). Novel Promoter Is Involved in the Expression of Estrogen Receptor in Human Testis and Epididymis. *Endocrinology*, 9, 3397-3404.
- **Burkhardt R.**, Kettner G., Bohm W., Schmidmeier M., Schlag R., Frisch B., Mallmann B., Eisenmenger W., Gilg T. (1987). Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone*, 8, 157–164.
- **Carani C.**, Qin K., Simoni M., Faustini-Fustini M., Serpente S., Boyd J., Korach K. S., Simpson E. R. (1997). Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 337, 91-95.
- **Castles C. G.**, Oesterreich S., Hansen R., Fuqua S. A. W. (1997). Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 62, 155–163.
- **Castoria G.**, Barone M. V., Di Domenico M., Bilancio A., Ametrano D., Migliaccio A., Auricchio F. (1999). Non-transcriptional action of oestradiol and progesterin triggers DNA synthesis. *EMBO J.*, 18, 2500–2510.

- **Chalbos D.**, Galtier F. (1994). Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor on estradiol-dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, 269 23007–23012.
- **Chen H.**, Tini M., Evans R. M. (2001). HATs on and beyond chromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 218-224.
- **Chen Z.**, Yuhanna I. S., Galcheva-Gargova Z., Karas R. H., Mendelsohn M. E., Shaul P. W. (1999). Estrogen receptor mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest.* 103, 401–406.
- **Choi J. M.**, Romeo R. D., Brake W. G., Bethea C. L., Rosenwaks Z., McEwen B. S. (2003). Estradiol increases pre- and post-synaptic proteins in the CA1 region of the hippocampus in female rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, 144, 4734-4738.
- **Civitelli R.**, Agnusdei D., Nardi P., Zacchei F., Avioli L. V., Gennari C. (1988). Effects of one-year treatment with estrogens on bone mass, intestinal calcium absorption, and 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase reserve in postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.*, 42, 77-86.
- **Clark D. E.**, Poteet-Smith C. E., Smith J. A., Lannigan D. A. (2001). Rsk2 allosterically activates estrogen receptor alpha by docking to the hormone-binding domain. *EMBO J.*, 20, 3484-3494.
- **Cohn C. S.**, Sullivan J. A., Kiefer T., Hill S. M. (1999). Identification of an enhancer element in the estrogen receptor upstream region: implications for regulation of ER transcription in breast cancer. *Mol. Cell Endocrinol.*, 158, 25–36.
- **Couse J. F.**, Bunch D. O., Lindzey J., Schomberg D. W., Korach K. S. (1999). Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology*, 140, 5855–5865.
- **Couse J. F.**, Curtis S. W., Washburn T. F., Lindzey J., Golding T. S., Lubahn D. B., Smithies O., Korach K. S. (1995). Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol*, 9, 1441-1454.
- **Couse J. F.**, Korach K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews*, 20, 358-417.

- **Dahlman-Wright K.**, Baumann H., McEwan I. J., Almlöf T., Wright A. P. H., Gustafsson J.-Å., Hard T. (1995). Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 1699–1703.
- **Dahlman-Wright K.**, McEwan I. J. (1996). Structural studies of mutant glucocorticoid receptor transactivation domains establish a link between transactivation activity *in vivo* and alpha-helix-forming potential *in vitro*. *Biochemistry*, 35, 1323–1327.
- **Dang Z. C.**, van Bezooijen R. L., Karperien M., Papapoulos S. E., Lowik C. W. (2002). Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res.*, 17, 394-405.
- **Danielian P. S.**, White R., Lees J. A., Parker M. G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J*, 11, 1025-1033.
- **Darimont B. D.**, Wagner R. L., Apriletti J. W., Stallcup M. R., Kushner P. J., Baxter J. D., Fletterick R. J., Yamamoto K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.*, 12, 3343-3356.
- **Dechering K.**, Boersma C., Mosselman S. (2000). Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr. Med. Chem.*, 7(5), 561-576.
- **DeConinck E. C.**, McPherson L. A., Weigel R. J. (1995). Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2191–2196.
- **Defranco D. B.**, Madan A. P., Tang Y., Chandran U. R., Xiao N., Yang J. (1995). Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors. *Vitam. Horm.*, 51, 315-338.
- **Delikat S.**, Harris R. J., Galvani D. W. (1993). II-1b inhibits adipocyte formation in human long-term bone marrow culture. *Exp Hematol.*, 21, 31-37.
- **Denger S.**, Reid G., Brand H., Kos M., Gannon F. (2001b). Tissue-specific expression of human ER α and ER β in the male. *Mol Cell Endocrinol.*, 178, 155-160.
- **Denger S.**, Reid G., Kos M., Flouriot G., Parsch D., Brand H., Korach K. S., Sonntag-Buck V., Gannon F. (2001). ER α gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol.*, 15, 2064-2077.

- **Deroo B. J.**, Korach K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.*, 116, 561-570.
- **Donaghue C.**, Westley B. R., May F. E. (1999). Selective promoter usage of the human estrogen receptor-gene and its regulation by estrogen. *Mol. Endocrinol.*, 13, 1934–1950.
- **Dupont S.**, Krust A., Gansmuller A., Dierich A., Chambon P., Mark M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development*, 127(19), 4277-4291.
- **Eddy E. M.**, Washburn T. F., Bunch D. O., Goulding E. H., Gladen B. C., Lubahn D. B., Korach K. S. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*, 137, 4796–4805.
- **Egea P. F.**, Mitschler A., Rochel N., Ruff M., Chambon P., Moras D. (2000). Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO J.*, 19, 2592-2601.
- **Enmak E.**, Pelto-Huikko M., Gradien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson J. A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(12), 4358-4265.
- **Ernst M.**, Schmid C. H. , Froesch E. R. (1988). Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 2307-2310.
- **Farhat M. Y.**, Abi-Younes S., Ramwell P. W. (1996). Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol*, 51, 571-576.
- **Farhat M. Y.**, Lavigne M. C., Ramwell P. W. (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J*, 10, 615-624.
- **Finger F.**, Schörle C., Zien A., Gebhard P., Goldring M. B., Aigner T. (2003). Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis & Rheumatism*, 48 (12), 3395-3403.

- **Fink G.**, Sumner B. E. H., McQueen J. K., Wilson H. and Rosie R. (1998). Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 25, 764-775.
- **Flouriot G.**, Brand H., Denger S., Metivier R., Kos M., Reid G., Sonntag-Buck V., Gannon F. (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.
- **Flouriot G.**, Griffin C., Kenealy M., Sonntag-Buck V., Gannon F. (1998). Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol.*, 12, 1939-1954.
- **Font de Mora J.**, Brown M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol.*, 20, 5041-5047.
- **Forman B. M.**, Samuels H. H. (1990). Dimerization among nuclear hormone receptors. *New. Biol.*, 2(7), 587-59.
- **Fraser R. A.**, Heard D. J., Adam S., Lavigne A. C., Le Douarin B., Tora L., Losson R., Rochette-Egly C., Chambon P. (1998). The putative Cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J. Biol. Chem.*, 273(26), 16199-16204.
- **Gambacchi M.**, Ciaponi M., Cappagli B., Piaggese L., De Simone L., Orlandi R., Genazzani A. R. (1997). Body weight, body fat distribution and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 414-417.
- **Gampe R. T., Jr.**, Montana V. G., Lambert M. H., Miller A. B., Bledsoe R. K., Milburn M. V., Kliewer S. A., Willson T. M., Xu H. E. (2000). Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell*, 5, 545-555.
- **Garcia T.**, Roman-Roman S., Jackson A., Theilhaber J., Connolly T., Spinella-Jaegle S., Kawai S., Courtois B., Bushnell S., Auberval M., Call K., Baron R. (2002). Behavior of osteoblast, adipocyte, and myoblast markers in genome-wide expression analysis of mouse calvaria primary osteoblasts in vitro. *Bone*, 31, 205-211.
- **Gimble J. M.**, Robinson C. E., Wu X., Kelly K. A. (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*, 19, 421-428.

- **Glass C. K.** (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.*, 15, 391-407.
- **Glass C. K., Rosenfeld M. G.** (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14, 121–141.
- **Goldring M. B.** (2000). The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 43, 1916-1926.
- **Grady D., Gebretsadik T., Kerlikowske K., Ernster V., Petitti D.** (1995). Hormone replacement and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Ostet. Gynecol.*, 85, 304-313.
- **Grandien K., Backdahl M., Ljunggren O., Gustafsson J. A., Berkenstam A.** (1995). Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology*, 136, 2223–2229.
- **Gray N. K., Wickens M.** (1998). Control of translation initiation in animals. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 14, 399–458.
- **Griffin C., Flouriot G., Sonntag-Buck V., Gannon F.** (1999). Two functionally different protein isoforms are produced from the chicken estrogen receptor- α gene. *Mol Endocrinol*, 13, 1571-1587.
- **Griffin C., Flouriot G., Sonntag-Buck V., Nestor P. V., Gannon F.** (1998). Identification of novel chicken estrogen receptor-messenger ribonucleic acid isoforms generated by alternative splicing and promoter usage. *Endocrinology*, 139, 4614–4625.
- **Gustafsson J.-A.** (1999). Estrogen receptor beta – a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol.*, 163(3), 379-383.
- **Hadzopoulou-Cladaras M., Kistanova E., Evagelopoulou C., Zeng S., Cladaras C., Ladas J. A.** (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*, 272, 539–550.
- **Harris S. A., Enger R. J., Riggs B. L., Spelsberg T. C.** (1995). Development and Characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J. Bone Miner. Res.*, 10, 178-186.

- **Harvey B. J.**, Alzamora R., Healy V., Renard C., Doolan C. M. (2002). Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. A homage to Hans Ussing. *Biochem Biophys Acta.*, 1566, 116-128.
- **Heaney R. P.**, Recker R. R., Saville P. D. (1978). Menopausal changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med*, 92, 964–970.
- **Heim M.**, Frank O., Kampmann G., Sochocky N., Pennimpede T., Fuchs P., Hunziker W., Weber P., Martin I., Bendik I. (2003). The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, 145, 848-859.
- **Heine P. A.**, Taylor J. A., Iwamoto G. A., Lubahn D. B., Cooke P. S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 12729–12734.
- **Henderson B. E.**, Feigelson H. S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21, 427-433.
- **Hewitt S. C.**, Couse J. F., Korach K. S. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice – what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res.*, 2(5), 345-352.
- **Hirata S.**, Shoda T., Kato J., Hoshi K. (2003). Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab.* 14, 124-129.
- **Hong H.**, Kohli K., Garabedian M. J., Stallcup M. R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol.*, 17(5), 2735-2744.
- **Horwitz K. B.**, Jackson T. A., Bain D. L., Richer J. K., Takimoto G. S., Tung L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol.*, 10, 1167-1177.
- **Hughes D. E.**, Dai A., Tiffée J. C., Li H. H., Mundy G. R., Boyce B. F. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nature Med.*, 2, 1132-1136.
- **Ikegami A.**, Inoue S., Hosoi T., Kaneki M., Mizuno Y., Akedo Y., Ouchi Y., Orimo H. (1994). Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology*, 135, 782–788.

- **Imhof A.**, Yang X. J., Ogryzko V. V., Nakatani Y., Wolffe A. P., Ge H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol.*, 7, 689-692.
- **Jackson D. P.**, Hayden J. D., Quirke (1991). Improving the sensitivity and specificity of PCR amplification: Nested PCR. In McPherson M.J.P., Quirke P. u. Taylor G.R. (Hrsg.) PCR: A practical approach. Oxford University Press, Oxford, UK, 42-43.
- **Jensen E. V.**, DeSombre E. R. (1972). Mechanism of action of the female sex hormones. *Annu Rev Biochem.*, 41, 203-230.
- **Kahlert S.**, Nuedling S., van Eickels M., Vetter H., Meyer R., Grohe C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem.*, 275, 18447-18453.
- **Kallen J. A.**, Schlaeppi J. M., Bitsch F., Geisse S., Geiser M., Delhon I., Fournier B. (2002). X-ray structure of the hROR_LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure*, 10, 1697–1707.
- **Kato S.**, Masuhiro Y., Watanabe M., Kobayashi Y., Takeyama K. I., Endoh H., Yanagisawa J. (2000). Molecular mechanism of a cross-talk between estrogen and growth factor signalling pathways. *Genes Cells*, 5, 593-601.
- **Katzenellenbogen J. A.**, Katzenellenbogen B. S. (1996). Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol.*, 3, 529-536.
- **Kauser K.**, Rubanyi G. M. (1997). Potential cellular signaling mechanisms mediating upregulation of endothelial nitric oxide production by estrogen. *J Vascular Res*, 34, 229-236.
- **Keaveney M.**, Klug J., Dawson M. T., Nestor P. V., Neilan J. G., Forde R. C., Gannon F. (1991). Evidence for a previously unidentified upstream exon in the human oestrogen receptor gene. *J. Mol. Endocrinol.*, 1, 25–35.
- **Keeting P. E.**, Scott R. E., Colvard D. S., Han I. K., Spelsberg T. C., Riggs B. L. (1991). Lack of a direct effect of estrogen on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.*, 6, 297-304.

- **Ko M.**, Reid G., Denger S., Gannon F. (2001). Minireview: Genomic Organization of the Human ER Gene Promoter Region. *Mol Endocrinol*, 15, 2057-2063.
- **Kelly M. J.** and Levin E. R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12, 152–156.
- **Kember N. F.**, Walker K. V., (1971). Control of bone growth in rats. *Nature (London)*, 229, 428–429.
- **Klinge C. M.** (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic. Acids. Res.*, 29, 2905-2919.
- **Knoblauch R.**, Garabedian M. J. (1999). Role for Hsp90-Associated Cochaperone p23 in Estrogen Receptor Signal Transduction. *Mol. Cell. Biol.*, 19(5), 3748-3759.
- **Kozac M.** (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*, 108, 229-241.
- **Kraus W. L.**, McInerney E. M., Katzenellenbogen B. S. (1995). Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92(26), 12314-12318.
- **Krege J. H.**, Hodgin J. B., Couse J. F., Enmark E., Warner M., Mahler J. F., Sar M., Korach K. S., Gustafsson J. A., Smithies O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 15677-15682.
- **Kuiper G. G. J. M.**, Carlsson B., Gradien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.-A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-870.
- **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.
- **Kushner P. J.**, Agard D. A., Greene G. L., Scanlan T. S., Shiau A. K., Uht R.M., Webb P. (2000). Estrogen receptor pathways to ap-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 74, 311-317.

- **Kussie P. H.**, Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A. J., Pavletich N. P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274, 948–953.
- **Lees J. A.**, Fawell S. E., Parker M. G. (1989). Identification of two transactivation domains in mouse oestrogen receptor. *Nucleic Acids Res*, 17, 5477-5488.
- **Lopez G. N.**, Turck C. W., Schaufele F., Stallcup M. R., Kushner P. J. (2001). Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. *J Biol Chem.*, 276, 22177-22182.
- **Lubahn D. B.**, Moyer J. S., Golding T. S., Couse J. F., Korach K. S., Smithies O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 11, 162–166.
- **Mahato D.**, Goulding E. H., Korach K. S., Eddy E. M. (2000). Spermatogenic cells do not require estrogen receptor alpha for development or function. *Endocrinology*, 141, 1273-1276.
- **Mangelsdorf D. J.**, Evans R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83, 841-850.
- **Mangelsdorf D. J.**, Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83, 835-839.
- **Manolagas S. C.**, Jilka R. L. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*, 332, 305–311.
- **Martin R. B.**, Chow B. D., Lucas P. A. (1990). Bone marrow fat content in relation to bone remodeling and serum chemistry in intact and ovariectomized dogs. *Calcif Tissue Int.*, 46, 189-194.
- **Masoud I.**, Shapiro F., Moses A. (1986). Tibial epiphyseal development: a cross-sectional histologic and histomorphometric study in the New Zealand white rabbit. *J. Orthop. Res.*, 4, 212–220.
- **McDonnell D. P.**, Clemm D. L., Hermann T., Goldman M. E., Pike J.W. (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol.*, 9, 659-669.

- **McEwan I. J.**, Dahlman-Wright K., Ford J., Wright A. P. (1996). Functional interaction of the c-Myc transactivation domain with the TATA binding protein: evidence for an induced fit model of transactivation domain folding. *Biochemistry*, 35, 9584–9593.
- **McEwen B. S.**, Alves S. E., Bulloch K. And Weiland N. G. (1997). Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology*, 48 (Suppl. 7), 8-15.
- **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.
- **McKenna N.**, Lanz R., O'Malley B. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, 20, 321–344.
- **McNamara B.**, Winter D. C., Cuffe J. E., O'Sullivan G. C., Harvey B. J. (1995). Mechanism of estrogen induced salt and water retention. *Surgical Forum*, 81, 560-562.
- **McPherson L. A.**, Baichwal V. R., Weigel R. J. (1997). Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4342–4347.
- **McPherson L. A.**, Weigel R. J. (1999). AP2 and AP2: a comparison of binding site specificity and trans-activation of the estrogen receptor promoter and single site promoter constructs. *Nucleic Acids Res.*, 27, 4040–4049.
- **Menasce L. P.**, White G. R., Harrison C. J., Boyle J. M. (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*, 17(1), 263-265.
- **Mendelsohn M. E.**, Karas R. H. (1994). Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol*, 9, 619-626.
- **Meunier P.**, Aaron J., Edouard C., Vignon G. (1971). Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin. Orthop.*, 80, 147-154.
- **Mikkola T.**, Viinikka L., Ylikorkala O. (1998). Estrogen and postmenopausal estrogen/progestin therapy: effect on endothelium-dependent prostacyclin, nitric

oxide and endothelin-1 production. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 79, 75-82.

- **Minaire P.**, Meunier P. J., Edouard C., Bernard J., Courpron J., Bourret J. (1974). Quantitative histological data on disuse osteoporosis. *Calcif Tissue Res.*, 17, 57-73, *Miner. Res*, 14, 187-191.
- **Mizutani T.**, Nishikawa Y., Adachi H., Enotomo T., Ikegami H., Kurohisa H., Nomura T., Miyake A. (1994). Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 950-954.
- **Morey A. K.**, Razandi M., Pedram A., et al. (1998). Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J*, 330, 1097-1105.
- **Morishima A.**, Grumbach M. M., Simpson E. R., Fisher C., Qin K. (1995). Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, 3689-3698.
- **Mueller-Fahrnow A.**, Egner U. (1999). Ligand-binding domain of estrogen receptors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(6), 550-556.
- **Nestor P. V.**, Forde R. C., Webb P., Gannon F. (1994). The genomic organization, sequence and functional analysis of the 5' flanking region of the chicken estrogen receptor gene. *J Steroid Biochem*, 50, 121-130.
- **Nickenig G.**, Baumer A. T., Grohe C., et al. (1998). Estrogen modulates At1 receptor gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Circulation*, 97, 2197-2201.
- **Nilsson O.**, Abad V., Chrysis D., Ritzen E. M., Savendahl L., Baron J. (2002). Estrogen receptor-alpha and -beta are expressed throughout postnatal development in the rat and rabbit growth plate. *J Endocrinol.*, 173, 407-414.
- **Nolte R. T.**, Wisely G. B., Westin S., Cobb J. E., Lambert M. H., Kurokawa R., Rosenfeld M. G., Willson T. M., Glass C. K., Milburn M. V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 395, 137-143.
- **Norris J. D.**, Fan D., Kerner S. A., McDonnell D. P. (1997). Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.*, 11,747-754.

- **Notelovitz M.** (1997). Estrogen therapy and osteoporosis: principles & practice. *Am J Med Sci*, 313, 2-12.
- **Nuttall M. E., Gimble J. M.** (2000). Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone*, 27, 177–184.
- **Nuttall M. E., Gimble J. M.** (2004). Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol.*, 4, 290-294.
- **Nuttall M. E., Patton A. J., Olivera D. L., Nadeau D. P., Gowen M.** (1998). Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J. Bone Miner. Res.*, 13, 371-382.
- **Okazaki R., Inoue D., Shibata M., Saika M., Shinsuke K., Ooka H., Tomiyama H., Sakamoto Y., Matsumoto T.** (2002). Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*. 43, 2349-2356.
- **Okuda Y., Hirata S., Watanabe N., Shoda T., Kato J., Hoshi K.** (2003). Novel splicing events of untranslated first exons in human estrogen receptor alpha (ER α) gene. *Endocrine Journal*, 50, 97-104.
- **Oreffo R. O. C., Kusec V., Romberg S., Triffitt J. T.** (1999). Human Bone Marrow Osteoprogenitors Express Estrogen Receptor-Alpha and Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 mRNA During Osteoblastic Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75, 382–392.
- **Österlund M. K., Grandien K., Keller E., Hurd Y. L.** (2000). The human brain has distinct regional expression patterns of estrogen receptor alpha mRNA isoforms derived from alternative promoters. *J Neurochem.*, 75, 1390-1397.
- **Oursler E. J., Osdoby P., Pyfferoen J., Riggs B. L.** (1991). Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6613–6617.
- **Pakdel F., Le Guellec C., Vaillant C., Le Roux M. G., Valotaire Y.** (1989). Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs. *Mol. Endocrinol.*, 3, 44–51.

- **Park S. R.**, Oreffo R. O., Triffitt, J. T. (1999). Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone.*, 24, 549-554.
- **Pedersen S. B.**, Borglum J. D., Eriksen E. F., Richelsen B. (1991). Nuclear estradiol binding in rat adipocytes regional variations and regulatory influences of hormones. *Biochim Biophys Acta*, 1093, 80-86.
- **Penolazzi L.**, Lambertini E., Aguiari G., del Senno L., Piva R. (2000). Cis element "decoy" against the upstream promoter of the human estrogen receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1492, 560–567.
- **Peters G. A.**, Khan S. A. (1999). Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol. Endocrinol.*, 13(2), 286-296.
- **Pham T. A.**, Hwung Y. P., Santiso-Mere D., McDonnell D. P., O'Malley B. W. (1992). Ligand-dependent and -independent function of the transactivation regions of the human estrogen receptor in yeast. *Mol Endocrinol*, 6, 1043–1050.
- **Piva R.**, Bianchi N., Aguiari L., Gambary R., Senno L. D. (1993). Sequencing of an RNA transcript of the human estrogen receptor gene: evidence for a new transcriptional event. *J. Steroid Mol. Biol.*, 46, 531–538.
- **Ponglikitmongkol M.**, Green S., Chambon P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.*, 7, 3385-3388.
- **Pratt W. B.**, Toft D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18(3), 306-360.
- **Qu Q.**, Perala-Heape M., Kapanen A., Dahllund J., Salo J., Vaananen H. K., Harkonen P. (1998). Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, 22, 201-209.
- **Radhakrishnan I.**, Perez-Alvarado G. C., Parker D., Dyson H. J., Montminy M. R., Wright P. E. (1997). Solution structure of the Kix domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator-coactivator interactions. *Cell*, 91, 741–752.
- **Razandi M.**, Pedram A., Levin E. R. (2000) Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 14, 1434–1447.

- **Reid G.**, Denger S., Kos M., Gannon F. (2002). Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci.*, 59, 821-831.
- **Renaud J. P.**, Moras D. (2000) Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci.*, 57, 1748–1769.
- **Revelli A.**, Pacchioni D., Cassoni P., Bussolati G., Massobrio M. (1996). In situ hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary. *Gynecol. Endocrinol.*, 10,177–186.
- **Robinson J. A.**, Harris S. A., Riggs B. L., Spelsberg T. C. (1997). Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*, 138, 2919-2927.
- **Rodan G. A.**, Martin T. J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 289, 1508-1514.
- **Rogatsky I.**, Zarembek K. A., Yamamoto K. R. (2001). Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *EMBO J*, 20, 6071–6083.
- **Rozman C.**, Feliu E., Berga L., Reverter J. C., Climent C., Ferran M. J. (1989). Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. *Exp. Hematol.*, 17, 34-37.
- **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.
- **Saceda M.**, Lippman M. E., Chambon P., Lindsey R. L., Ponglikitmongkol M., Puente M., Martin M. B. (1988). Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Mol. Endocrinol.*, 2, 1157–1162.
- **Safe S.** (2001). Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-sp1 interactions. *Vitam. Horm.*, 62, 231-252.

- **Saika M.**, Inoue D., Kido S., Matsumoto T. (2001). 17 β -estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor. *Endocrinology*, 142, 2205–2212.
- **Savkur R. S.**, Burris T. P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res.*, 63(3), 207-212.
- **Scheven B. A. A.**, Damen C. A., Hamilton N. J., Verhaar H. J. J., Duursma S. A. (1992). Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 186, 54-60.
- **Schuur E. R.**, McPherson L. A., Yang G. P., Weigel R. J. (2001). Genomic structure of the promoters of the human estrogen receptor-gene demonstrate changes in chromatin structure induced by AP2. *J. Biol. Chem.*, 276, 15519–15526.
- **Shen F.**, Triezenberg S. J., Hensley P., Porter D., Knutson J. R. (1996). Transcriptional activation domain of the herpes virus protein VP16 becomes conformationally constrained upon interaction with basal transcription factors. *J Biol Chem*, 271, 4827–4837.
- **Shiau A. K.**, Barstad D., Loria P. M., Cheng L., Kushner P. J., Agard D. A., Greene G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, 927-937.
- **Shiau A. K.**, Barstad D., Radek J. T., Meyers M. J., Nettles K. W., Katzenellenbogen B. S., Katzenellenbogen J. A., Agard D. A., Greene G. L. (2002). Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nat Struct Biol*, 9, 359–364.
- **Shughrue P. J.**, Bushnell C. D., Dorsa D. M. (1992). Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology*, 131, 381–388.
- **Shughrue P. J.**, Lane M. V., Merchenthaler I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.*, 388, 507-525.
- **Shupnik M. A.**, Gordon M. S., Chin W. W. (1989). Tissue specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Mol. Endocrinol.*, 3, 660–665.

- **Sigurjonsdottir T. J.**, Hayles A.B. (1968). Precocious puberty. A report of 96 cases. *Am J Dis Child.*, 115, 309-321.
- **Simerly R. B.**, Young B. J. (1991). Regulation of estrogen receptor messenger RNA in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol. Endocrinol.*, 5, 424–432.
- **Smith E. P.**, Boyd J., Frank G. R., Takahashi H., Cohen R. M., Specker B., Williams T. C., Lubahn D. B., Korach K. S. (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.*, 331, 1056-1061.
- **Spelsberg T. C.**, Subramaniam M., Riggs B. L., Khosla S. (1999). The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol*, 13, 819–828.
- **Stein G. S.**, Lian J. B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Rev* 14, 424-442.
- **Stockard C. R.**, Papanicolaou G. N. (1917). The existence of a typical oestrous cycle in the guinea pig with a study of it histological and physiological changes. *Amer. J. Anat.*, 22, 225-228.
- **Subramaniam N.**, Treuter E., Okret S. (1999). Receptor interacting protein RIP140 inhibits both positive and negative gene regulation by glucocorticoids. *J Biol Chem*, 274, 18121–18127.
- **Szreder T.**, Zwierzchowski L. (2004). Polymorphism within the bovine estrogen receptor-alpha gene 5'-region. *J. Appl. Genet.*, 45(2), 225-236.
- **Takano-Yamamoto T.**, Rodan G.A. (1990). Direct effects of 17 beta-estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 87, 2172-2176.
- **Tang Z.**, Treilleux I., Brown M. (1997). A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers. *Mol. Cell Biol.*, 17, 1274–1280.
- **Tanimoto K.**, Eguchi H., Yoshida T., Hajiro-Nakanishi K., Hayashi S. (1999). Regulation of estrogen receptor α gene mediated by promoter B responsible for

its enhanced expression in human breast cancer. *Nucleic Acids Res.*, 27, 903–909.

- **Tasset D.**, Tora L., Fromental C., Scheer E., Chambon P. (1990). Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell*, 62, 1177-1187.
- **Thompson D. A.**, McPherson L. A., Carmeci C., DeConinck E. C., Weigel R. J. (1997). Identification of two estrogen receptor transcripts with novel 5' exons isolated from a MCF7 cDNA library. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 62, 143-153.
- **Tobias J. H.**, Compston J. E. (1999). Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women?. *Bone*, 24, 121-124.
- **Tonna E. A.** (1961). The cellular complement of the skeletal system studied autoradiographically with tritiated thymidine (H3TDR) during growth and aging. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 813–824.
- **Tora L.**, Gronemeyer H., Turcotte B., Gaub M.-P., Chambon P. (1988). The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature*, 333, 185–188.
- **Treilleux I.**, Peloux N., Brown M., Sergeant A. (1997). Human estrogen receptor (ER) gene promoter-P1: estradiol independent activity and estradiol inducibility in ER⁺ and ER⁻ cells. *Mol. Endocrinol.*, 11, 1319–1331.
- **Turner R. T.**, Riggs B. L., Spelsberg T. C. (1994). Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev*, 16, 275–300.
- **Turner,R.T.** (1999). Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res*, 14, 187-191.
- **Tzukerman M. T.**, Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M. G., Stein R. B., Pike J. W., McDonnell D. P. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*, 8, 21–30.
- **Uesugi M.**, Nyanguile O., Lu H., Levine A. J., Verdine G. L. (1997). Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science*, 277, 1310–1313.

- **Ushiyama T.**, Ueyama H., Inoue K., Ohkubo I., Hukuda S. (1999). Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 7, 560-566.
- **Vegeto E.**, Shahbaz M. M., Wen D. X., Goldman M. E., O'Malley B. W., McDonnell D. P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.*, 7, 1244-1255.
- **Vidal O.**, Lindberg M. K., Hollberg K., Baylink D. J., Andersson G., Lubahn D. B., Mohan S., Gustafsson J. A., Ohlsson C. (2000). Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97, 5474-5479.
- **Vidal O.**, Lindberg M., Sävendahl L., Lubahn D. B., Ritzen E. M., Gustafsson J. A., Ohlsson C. (1999). Disproportional body growth in female estrogen receptor-alpha-inactivated mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265, 569-571.
- **Walker K. V.**, Kember N. F. (1972). Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. I. Measurements in young male rats. *Cell Tissue Kinet.*, 5, 401-408.
- **Wang G. W.**, Sweet D., Reger S., Thompson R. (1977). Fat cell changes as a mechanism of avascular necrosis in the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg.*, 59, 729-735.
- **Wärnmark A.**, Treuter E., Wright A. P., Gustafsson J. A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol.*, 17, 1901-1909.
- **Wärnmark A.**, Wikstrom A., Wright A. P. H., Gustafsson J.-Å., Hard T. (2001). The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured *in vitro* and show different TBP binding properties. *J Biol Chem*, 276, 45939-45944.
- **Waters K. M.**, Rickard D. J., Riggs L., Khosla S., Katzenellenbogen J. A., Katzenellenbogen B. S., Moore J., Spelsberg T. C. (2001). Estrogen regulation of human osteoblast function is determined by the stage of differentiation and the estrogen receptor isoform. *J Cell Biochem.*, 83, 448-462.
- **Watkins R. E.**, Maglich J. M., Moore L. B., Wisely G. B., Noble S. M., Davis-Searles P. R., Lambert M. H., Kliewer S. A., Redinbo M. R. (2003). A crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry*, 42, 1430-1438.

- **Watters J. J.**, Campbell J. S., Cunningham M. J., Krebs E. G., Dorsa D. M. (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*, 138, 4030–4033.
- **Watts C. K.**, Parker M. G., King R. J. (1989). Stable transfection of the oestrogen receptor gene into a human osteosarcoma cell line. *J Steroid Biochem.*, 34, 483-490.
- **Weise M.**, De-Levi S., Barnes K. M., Gafni R. I., Abad V., Baron J. (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(12), 6871-6876.
- **Widmann C.**, Gibson S., Jarpe M. B., Johnson G. L. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol. Rev.*, 79, 143-180.
- **Windahl S. H.**, Andersson G., Gustafsson J. A. (2002). Elucidation of estrogen receptor function in bone with the use of mouse models. *Trends Endocrinol Metab.*, 13, 195-200.
- **Woolley C. S.** (1998). Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav*, 34, 140-148.
- **Wronski T. J.**, Walsh C. C., Ignaszewski L. A. (1986). Histological evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomised rats. *Bone*, 7, 119-123.
- **Wu X.**, Glinn M. A., Ostrowski N. L., Su Y., Ni B., Cole H. W., Bryant H. U., Paul S. M. (1999). Raloxifene and estradiol benzoate both fully restore hippocampal choline acetyltransferase activity in ovariectomized rats. *Brain Res*, 847, 98-104.
- **Zajickova K.**, Zofkova I. (2003). Osteoporosis: genetic analysis of multifactorial disease. *Endocr Regul.*, 37, 31-44.
- **Zhou S.**, Zilberman Y., Wassermann K., Bain S. D., Sadovsky Y., Gazit D. (2001). Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem.*, 81, 144-155.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze für die Überlassung des interessanten Themas sowie die ausgezeichnete Betreuung. Er stand mir sowohl während des experimentellen Teils, als auch bei der schriftlichen Ausarbeitung stets mit seinem Rat und wertvollen Anregungen zur Seite.

Danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. med. Franz Jakob für die Übernahme des Koreferats.

Frau Sabine Balling danke ich für die Einführung in die Methodik meiner Arbeit sowie für ihre engagierte Unterstützung.

Herrn Jan Michael Witter danke ich für seine Hilfe bei der Konzipierung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Isabell Homann
Geburtsdatum: 15.12.1978
Geburtsort: Hannover
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Nettelbeckstr. 12, 28201 Bemen
Tel./E-mail: 0421/3086096/ homannisa@gmx.net

Schullaufbahn

1985 – 1989 Grundschule Wendlandstraße, Hannover
1989 – 1991 Peter-Petersen Schule (Orientierungsstufe), Hannover
1991 – 1998 Kaiser-Wilhelm- und Ratsgymnasium, Hannover

Studium

05/1999 – 11/2005 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
04/2001 Physikum, Note: 1,66
03/2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
09/2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
11/2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 1,0
29/11/2005 Approbation

Famulaturen

08-09/2001	Chirurgie, Krankenhaus Siloah, Hannover
09-10/2002	Innere Medizin, Allgemeines Regional-Krankenhaus Bozen, Italien
02-03/2003	Pädiatrie, Praxis Dr. med. Wellmann, Würzburg
08/2003	Innere Medizin, Praxis Dr. med. Gerster, Internist- Sportmediziner, Bovenden
03/2004	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Gerdes, Hannover

Praktisches Jahr

10/04-02/05	Gynäkologie, Universitätsfrauenklinik Würzburg
02/05-05/05	Innere Medizin, Kantonsspital Luzern, Schweiz
06/05-09/05	Chirurgie, Chirurgische Klinik der Universität Würzburg

Beruflicher Werdegang

seit 04/2006	Assistenzärztin in der Frauenklinik des Diakoniekrankenhauses Bremen
--------------	---

Isabell Homann

