

Untersuchung alternativer Mechanismen der Genregulation durch Östrogenrezeptor-Isoformen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Flötotto

aus

Gütersloh

Düsseldorf

2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Univ.-Prof. Dr. Frank Wunderlich

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Peter Dall

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Februar 2002

Elektronisch veröffentlicht unter:

<http://www.ulb.uni-düsseldorf.de/diss/mathnat/2002/flötotto.html>

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DIE STEROIDREZEPTOR-FAMILIE.....	1
1.2	DIE HUMANEN ÖSTROGENREZEPTOREN.....	2
1.2.1	<i>ERα</i>	3
1.2.2	<i>ERβ</i>	4
1.2.3	<i>Gewebeverteilung und Funktionen von ERα und ERβ</i>	5
1.2.4	<i>Varianten der Östrogenrezeptoren</i>	6
1.3	REGULATION DER TRANSKRIPTION DURCH ÖSTROGENREZEPTOREN.....	7
1.3.1	<i>Regulation von Promotoren mit ERE-Elementen</i>	7
1.3.2	<i>Regulation von Promotoren ohne ERE-Elemente</i>	9
1.4	KOAKTIVATOREN UND KOREPRESSOREN DER ÖSTROGENREZEPTOREN.....	10
1.4.1	<i>Die p160 Familie der Koaktivatoren</i>	11
1.4.2	<i>Die p300 Koaktivatoren</i>	13
1.4.3	<i>Korepressoren</i>	13
1.5	NICHTGENOMISCHE ÖSTROGEN-EFFEKTE.....	14
1.6	ÖSTROGENWIRKUNG IN DER KARZINOGENESE.....	15
1.7	SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATORS (SERMS).....	16
2	PROBLEMSTELLUNG.....	18
3	MATERIAL UND METHODEN.....	19
3.1	MIKROORGANISMEN.....	19
3.2	NUKLEINSÄUREN.....	19
3.2.1	<i>Plasmide</i>	19
3.2.2	<i>Primer</i>	19
3.3	ZELLKULTUR.....	20
3.3.1	<i>Zelllinien</i>	20
3.3.2	<i>Kulturmedien und Zusätze</i>	22
3.3.3	<i>Behandlung von FCS mit Aktivkohle</i>	22
3.3.4	<i>Kultivierung der Zelllinien</i>	23
3.3.5	<i>Subkultivierung von Monolayerkulturen</i>	23
3.3.6	<i>Bestimmung des Zelltiters</i>	23
3.3.7	<i>Kryokonservierung</i>	24
3.4	DNA-ISOLIERUNG.....	24
3.4.1	<i>Plasmid Minipräparation aus E. coli</i>	24
3.4.2	<i>Plasmid Midi- und Maxipräparation aus E. coli</i>	25
3.4.3	<i>Isolierung genomischer DNA aus Gewebe</i>	26
3.4.4	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	26
3.5	RNA-ISOLIERUNG.....	26
3.5.1	<i>Isolierung von RNA aus Gewebe</i>	27
3.5.2	<i>RNA-Isolierung aus Zelllinien</i>	27
3.6	cDNA SYNTHESE.....	27
3.6.1	<i>Kontrolle der cDNA durch β-Actin PCR</i>	28
3.7	AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	28
3.7.1	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	28
3.7.2	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</i>	30
3.8	SEQUENZIERUNG VON DNA.....	31
3.8.1	<i>Sequenzier-Reaktion</i>	31
3.9	KLONIERUNG.....	32
3.9.1	<i>Restriktion von DNA</i>	32
3.9.2	<i>Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	33
3.9.3	<i>DNA-Ligation</i>	33
3.9.4	<i>Transformation von E. coli mit der CaCl₂ Methode</i>	34
3.9.5	<i>Transformation durch Elektroporation</i>	35
3.10	DNA-DNA HYBRIDISIERUNG.....	36
3.10.1	<i>Koloniefilterhybridisierung</i>	36
3.10.2	<i>Southern-Transfer</i>	36
3.10.3	<i>Markierung von DNA</i>	37

3.10.4	Hybridisierung von DNA.....	38
3.10.5	Immunologischer Nachweis.....	38
3.11	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	39
3.11.1	Quantitative RT-PCR	40
3.12	REPORTERGEN ASSAYS	41
3.12.1	Transfektion humaner Zelllinien mit Fugene TM	42
3.12.2	Transfektion mit Lipofektamin TM	43
3.12.3	Transfektion durch Elektroporation.....	44
3.12.4	Messung der Luciferase-Aktivität.....	44
3.12.5	Messung der Galaktosidase-Aktivität.....	45
4	ERGEBNISSE.....	46
4.1	GENREGULATION ÜBER AP-1- UND ERE-ELEMENTE	46
4.1.1	Etablierung der Methodik.....	46
4.1.2	Regulation von ERE2-TK-Luc in SK-BR-3-Zellen.....	51
4.1.3	Regulation von pAP-1-Luc in SK-BR-3-Zellen.....	53
4.1.4	Regulation von pAP-1-Luc in U2-OS-Zellen.....	55
4.1.5	Transaktivierung durch VP-16-Varianten	57
4.1.6	Bedeutung von AF1 und AF2 bei der Transaktivierung von pAP-1-Luc.....	60
4.1.7	SRC-1 vermittelt die Repression über ERβ/E2.....	61
4.1.8	CBP stimuliert die Transaktivierung durch Antiöstrogene über ERβ.....	63
4.1.9	ERβ2 wird in humanen Tumoren nicht exprimiert.....	65
4.2	REGULATION DER PROGESTERONREZEPTOR-PROMOTOREN	67
4.2.1	Konstruktion von Reporter-Plasmiden	67
4.2.2	Regulation von PR _A durch ERα und ERβ.....	69
4.2.3	Regulation von PR _B durch ERα und ERβ.....	70
4.2.4	Bedeutung von AF1 und AF2 für die Regulation von ERE2-TK-Luc.....	72
4.2.5	Bedeutung von AF1 und AF2 für die Regulation von PR _B	73
4.2.6	Repression von PR _B über AF2 in SK-BR-3-Zellen.....	76
4.2.7	SRC-1 verstärkt die Repression in SK-BR-3-Zellen.....	77
5	DISKUSSION	79
5.1	REGULATION VON PROMOTOREN MIT AP-1 UND ERE-ELEMENTEN.....	79
5.1.1	Regulation von ERE2-TK-Luc und pAP-1-Luc	80
5.1.2	Transaktivierung durch VP-16-Varianten	82
5.1.3	Bedeutung der ER-Aktivierungsfunktionen für die Regulation von pAP-1-Luc.....	83
5.1.4	Bedeutung von SRC-1 für die Regulation von pAP-1-Luc	84
5.1.5	Bedeutung von CBP für die Regulation von pAP-1-Luc	85
5.1.6	ERβ2 kommt beim Menschen nicht vor.....	86
5.1.7	Modell der Östrogen-vermittelten Regulation von AP-1-Elementen	87
5.1.8	Modell der Antiöstrogen-vermittelten Regulation von AP-1-Elementen.....	89
5.2	REGULATION DER PROMOTOREN DES PROGESTERONREZEPTORS	90
5.2.1	PR _A wird weder durch ERα noch durch ERβ stimuliert.....	91
5.2.2	Stimulation von PR _B durch Östrogen	92
5.2.3	Repression von PR _B durch Östrogen.....	95
5.2.4	Stimulation von PR _B durch Antiöstrogene	96
5.2.5	Modell der Regulation von PR _B	97
5.2.6	Physiologische Relevanz der Experimente.....	98
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	100
7	LITERATUR.....	101
8	ANHANG.....	121
8.1	ABKÜRZUNGEN UND MEDIZINISCHE FACHBEGRIFFE.....	121
8.2	PLASMIDE	123

1 Einleitung

Lipophile Steroidhormone wie z.B. Östrogen, Progesteron, Androgene, Glucocorticoide und Mineralcorticoide werden von endokrinen Zellen synthetisiert. Sie gelangen mit dem Blutstrom zu Ihren Wirkorten, wo sie durch Diffusion in die Zellen eindringen und an spezifische Rezeptoren binden. Nach der Bindung des Liganden kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Hormonrezeptoren (HR). Diese können dann spezifisch an konservierte DNA-Elemente (hormone responsive elements = HRE) oder an andere Transkriptionsfaktoren binden und die Transkription von cis lokalisierten Genen modifizieren (Gottlicher et al., 1998; Tsai und O'Malley, 1994). Bei Säugern haben die Steroidhormone eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Sie regulieren die Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Funktion einer großen Zahl unterschiedlicher Zelltypen (Beato et al., 1995; Mangelsdorf et al., 1995). Vermutlich wird fast jeder Gewebetypus durch mindestens eines der verschiedenen Steroidhormone beeinflusst.

1.1 Die Steroidrezeptor-Familie

Das erste Modell für die Genregulation durch Hormonrezeptoren wurde bereits Ende der 60iger Jahre vorgestellt (Jensen et al., 1968). Es dauerte aber noch bis zur Mitte der 80iger Jahre bis der zugrundeliegende Mechanismus im Detail aufgeklärt werden konnte (Evans, 1988). Zu dieser Zeit wurden cDNAs für eine immer größere Anzahl nukleärer Rezeptoren kloniert, was die Aufklärung der Rezeptorstruktur ermöglichte. Mittlerweile repräsentiert die Familie der Steroidrezeptoren die größte bekannte Gruppe der Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten (Becker-Andre et al., 1993; Chang et al., 1988; Evans, 1988; Hamada et al., 1989; Koelle et al., 1991; Lubahn et al., 1988; Mangelsdorf et al., 1992; McDonnell et al., 1987). Zu ihr gehören neben den Rezeptoren für die Steroidhormone Östrogen (ER), Progesteron (PR), Glucocorticoid (GR) und Androgen (AR) auch die Rezeptoren für das Thyroid Hormon (TR), Vitamin D (VDR), Retinoiesäure (RAR) und Ecdyson (EcR) (Ming und O'Mally, 1994). Außerdem wurde eine große Zahl von neuen Genen identifiziert, die hohe Sequenzhomologie zu den bereits bekannten Steroidrezeptoren aufweisen. Da für die meisten dieser Rezeptoren noch kein Ligand bekannt ist, werden diese auch als „orphan receptors“ bezeichnet (Becker-Andre et al., 1993; Enmark und Gustafsson, 1996). Für einige dieser Rezeptoren konnte jedoch später ein spezifischer Ligand identifiziert werden. So sind beispielsweise die Liganden für den Benzoat-X-Rezeptor (BXR) (Blumberg et al., 1998), den Farenosid-X-Rezeptor (FXR) (Kozak et al., 1996) und den humanen Pregnanrezeptor (PAR) (Boyd et al., 1987) mittlerweile bekannt. Aufgrund von Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Rezeptoren wurde vorgeschlagen, die Rezeptorstruktur in sechs verschiedene Regionen einzuteilen, die mit den Buchstaben A-F bezeichnet werden (Abbildung 1.2.1.1) (Krust et al., 1986).

Die N-terminalen Regionen A und B sind am geringsten konserviert. Sie enthalten in vielen Fällen eine Transaktivierungsfunktion (AF). Diese aktiviert die Transkription von hormonregulierten Genen durch Interaktion mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren (Giguere et al., 1986; Giguere et al., 1987; Godowski et al., 1988; Hollenberg und Evans, 1988; Kumar et al., 1987; Tora et al., 1989; Webster et al., 1988). Rezeptor-Isoformen die den gleichen Liganden binden unterscheiden sich oft nur in diesen beiden Regionen. Dennoch können solche Isoformen oftmals unterschiedliche Gene aktivieren (Keightley, 1998). Die Länge dieser Regionen kann zwischen 20 Aminosäuren beim Vitamin-D₃-Rezeptor und 600 Aminosäuren beim Mineralcorticoidrezeptor (MR) schwanken. Aufgrund dieser Unterschiede ist es unwahrscheinlich, daß die spezifische Transaktivierungsfunktion bei allen nukleären Rezeptoren erhalten ist.

Die C-Region ist hochgradig konserviert und beinhaltet zwei TypII-Zinkfinger, welche für die DNA-Bindung und Dimerisierung essentiell sind (Luisi et al., 1991). An die C-Region schließt sich eine variable Verbindungsregion an. Diese erlaubt den Rezeptoren eine Konformationsänderung und enthält oftmals eine Signalsequenz für die Kernlokalisierung des Rezeptors (GR, PR, ER). Außerdem kann in dieser Region eine zusätzliche Transaktivierungsfunktion lokalisiert sein (TR, GR)(Giguere et al., 1986; Godowski et al., 1988; Hollenberg und Evans, 1988; Picard und Yamamoto, 1987). Die E-Region ist vergleichsweise groß (~250 Aminosäuren) und enthält Bereiche, die für Kernlokalisierung, Ligandenbindung, Dimerisierung und intramolekulare Repression (PR) verantwortlich sind (Banahmad und Tsai, 1993; Bocquel et al., 1989; Cooney et al., 1993; Evans, 1988; Guiochon-Mantel et al., 1989; Kumar et al., 1987; Picard und Yamamoto, 1987; Pike et al., 2000; Pratt, 1993; Webster et al., 1988). Die C-terminale F-Region ist sehr variabel und ist bei den meisten Rezeptoren ohne Funktion (Kumar et al., 1987).

Die nukleären Rezeptoren werden nach der Art der DNA-Bindung in zwei Gruppen eingeteilt. Während Klasse-I-Rezeptoren wie GR, PR, ER, AR und MR als Homodimere an palindromische Zielsequenzen binden, können die Klasse-II-Rezeptoren wie z.B. der TR, RAR, VDR, RXR direkte Wiederholungen ihrer Zielsequenzen binden (Cooney et al., 1992; Naar et al., 1991). Klasse-II-Rezeptoren können im Gegensatz zu Klasse-I-Rezeptoren auch Heterodimere aus Rezeptoren für verschiedene Liganden bilden (Cooney et al., 1993; Leid et al., 1992; Yu et al., 1991).

1.2 Die humanen Östrogenrezeptoren

Östrogen wird vor allem in den Ovarien gebildet, kann aber auch im peripheren Fettgewebe durch die Aromatisierung von Androgenen entstehen (Korach et al., 1996). Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktion von verschiedenen reproduktiven Geweben z.B. im Uterus, Ovar, Vagina, und Mamma (Katzenellenbogen, 1996). Außerdem konnten Wirkungen auf nichtreproduktive Gewebe wie z.B. Knochen, Gehirn und Gefäßsystem nachgewiesen werden (Sarrel et al., 1994). Östrogen vermittelt seine vielfältigen physiologischen Funktionen hauptsächlich

über zwei Ligand-induzierte nukleäre Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Steroidrezeptoren, die Östrogenrezeptoren ER α und ER β , welche die Expression eines komplexen Gen-Netzwerkes regulieren (Enmark und Gustafsson, 1999; Kushner et al., 2000; Mangelsdorf et al., 1995).

1.2.1 ER α

Der humane Östrogenrezeptor ER α wurde aus der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 kloniert (Green et al., 1986). Das Gen für ER α wird von Chromosom 6 kodiert und besteht, wie die Gene aller Steroidrezeptoren, aus 8 Exons (Green et al., 1986). Das ER α Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 65.000 Da und besteht aus 595 Aminosäuren, die in drei Domänen angeordnet sind (Abbildung 1.2.1.1).

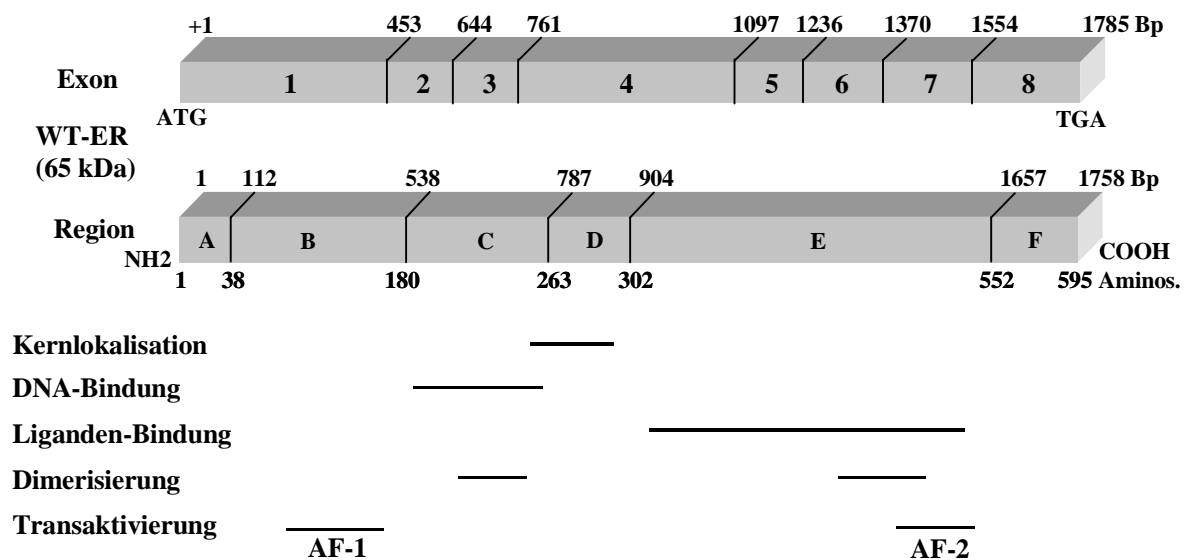


Abbildung 1.2.1.1: Die funktionellen Regionen der Steroidrezeptoren am Beispiel von ER α .

Die einzelnen Regionen von ER α (A-F, Mitte) sind dabei der Exonstruktur von ER α gegenübergestellt (oben). Die Lage der Rezeptorfunktionen, in Bezug auf mRNA und Protein, ist durch Linien dargestellt (unten).

Exon 1 und 2 kodieren für die N-terminale Domäne (Region A und B) die eine Transaktivierungsfunktion (AF1) enthält. Im Gegensatz zur C-terminal lokalisierte AF2 ist diese konstitutiv aktiv (Tora et al., 1989). Innerhalb dieser Domäne wurden verschiedene Abschnitte gefunden, die zellspezifisch in unterschiedlichem Umfang zur Transaktivierung beitragen (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995; Metzger et al., 1995). Die AF1-Region vermittelt zudem die Ligand-unabhängige Aktivierung durch Phosphorylierung (Kato et al., 1995).

Die etwa 100 Aminosäuren große DNA-bindende-Domäne (DBD) des Östrogenrezeptors wird von Exon 3 und Teilen von Exon 4 kodiert. Wie bei allen Steroidrezeptoren besteht diese Region aus zwei Zinkfingern, deren Struktur durch jeweils ein Zink-Atom stabilisiert wird, welches mit vier

Cystidin-Resten koordiniert ist. Beide Zinkfinger sind für die DNA-Bindung essentiell. Der erste Zinkfinger ist für die Bindung des ERE-Elementes verantwortlich, der zweite stabilisiert die DNA-Bindung des Östrogenrezeptors, durch Ionenbindung mit den Phosphatgruppen der DNA-Helix.

Teile von Exon 4 sowie die Exons 5-8 kodieren die 250 Aminosäuren große Hormon-bindende Domäne (HBD, Regionen E und F), welche die hormonabhängige Transaktivierungsfunktion (AF2) enthält. Wie bei allen Steroidrezeptoren, besteht diese Domäne aus 12 α -Helices, die eine Tasche bilden, welche die Bindung des Liganden ermöglicht (Brzozowski et al., 1997). Bei ER α führt die Bindung des Liganden zu einer Rotation der Helix 12, ohne das andere Helices beeinflusst werden (Shiau et al., 1998). Durch vergleichende Strukturanalysen verschiedener Steroidrezeptoren konnte gezeigt werden, daß eine Rotation von Helix 12 die Dissoziation von Korepressoren, Dimerisierung und die Assoziation von Koaktivatoren herbeiführt (Shiau et al., 1998). Die Östrogenbindung kann durch Antiöstrogene (z. B. Tamoxifen = TAM) blockiert werden, die kompetitiv an die Ligandenbindungsdomäne binden. In Abhängigkeit von der Struktur des Antiöstrogens kann dies zu einer vollständigen Inaktivierung oder partiellen Aktivierung/Inaktivierung des Östrogenrezeptors führen (Dutertre und Smith, 2000).

1.2.2 ER β

Bis Mitte der 90-iger Jahre war nur ein einziger Östrogenrezeptor bekannt. Zahlreiche Versuche einen zweiten Östrogenrezeptor aufgrund von Sequenzhomologien zu ER α zu klonieren waren gescheitert. Allerdings konnten dabei zwei „orphan“ Rezeptoren, genannt „estrogen related receptors“ (ERR) 1 und 2, kloniert werden, die auffällige Homologie zu ER α aufweisen (Giguere et al., 1988).

Später wurde jedoch die cDNA für einen zweiten Östrogenrezeptor aus dem Gewebe von Ratte (Kuiper et al., 1996), Mensch (Mosselman et al., 1996) und Maus (Tremblay et al., 1997) kloniert. Der neue Östrogenrezeptor wurde als ER β bezeichnet, der bereits bekannte Östrogenrezeptor als ER α . Die beiden Östrogenrezeptoren haben eine Sonderstellung unter den Steroidrezeptoren, da sie von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Varianten anderer Steroidrezeptoren entstehen durch alternative Transkription/Translation des gleichen Gens (Keightley, 1998).

Das Gen von ER β ist auf Chromosom 14 lokalisiert und kodiert ein 530 Aminosäuren großes Protein, das in Teilbereichen hohe Sequenzhomologie zu ER α aufweist. So unterscheiden sich die DNA-bindenden-Domänen der beiden Rezeptoren nur in 3 Aminosäuren voneinander. Daher ist es nicht überraschend, daß beide Östrogenrezeptoren das gleiche ERE binden (Hyder et al., 1999). Hingegen zeigt die aminoterminal Domäne (Region A/B) nur einen sehr geringen Grad an Homologie (20 %). Diese Region ist jedoch bei Mensch-, Maus- und Ratten-ER β hochgradig konserviert. Somit kann angenommen werden, daß diese Region funktionell bedeutsam ist. Eine hohe Variabilität in der aminoterminalen Region ist typisch für die Steroidrezeptoren und führt zumeist zu funktionellen Unterschieden. Zum Beispiel unterscheiden sich die Progesteronrezeptor-Isoformen A und B

ausschließlich in der N-terminalen Domäne, aktivieren aber Zelllinien-spezifisch unterschiedliche Gene (Tora et al., 1988). Es konnte gezeigt werden, daß die AF1 von ER β im Vergleich zu der des ER α sehr schwach ist, während die AF2 der beiden Östrogenrezeptoren etwa gleich stark ist. Die Aktivität von ER α ist daher stärker als die von ER β , wenn die Transaktivierung von beiden Transaktivierungsfunktionen abhängig ist (Delaunay et al., 2000).

Die Ligandenbindungsdomäne von ER α ist bei ER β mäßig konserviert (58 %) (Ogawa et al., 1998). Die Homologien zwischen den Ligandenbindungsdomänen der beiden Rezeptoren entspricht damit ungefähr der Homologie zwischen den Ligandenbindungsdomänen von Progesteronrezeptor und Glucocorticoidrezeptor. Dieser Vergleich läßt vermuten, daß ER α und ER β Rezeptoren mit unterschiedlicher Ligandenbindungsaffinität sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß beide Östrogenrezeptoren 17 β -Östradiol mit vergleichbarer Affinität binden und durch Antiöstrogene inhibiert werden können (Kuiper et al., 1997). Einige Phytoöstrogene werden von ER β erheblich besser gebunden als von ER α . Daher werden einige Phytoöstrogene, wie z.B. das Genistein, zumindest bei niedrigen Konzentrationen, als ER β spezifisch angesehen (Kuiper et al., 1997; Kuiper et al., 1998). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, daß ER β , wie z.B. der Vitamin-D-Rezeptor, Liganden aus der Nahrung bindet.

1.2.3 Gewebeverteilung und Funktionen von ER α und ER β

Die Gewebeverteilung von ER β deutet drauf hin, daß dieser ein wichtiger Östrogenrezeptor in verschiedenen Geweben wie z.B. im Knochengewebe, Kardiovaskulargewebe, Urogenitalgewebe sowie in Immunzellen und dem Zentral-Nervensystem (ZNS) ist (Byers et al., 1997; Gustafsson, 2000; Kuiper et al., 1996). Dies gilt insbesondere für die Ovarien, in denen ER β etwa neunmal höher exprimiert wird als ER α (Sar und Welch, 1999). ER α scheint der dominante Östrogenrezeptor im Uterus sowie in der Brust und in der Leber zu sein (Couse et al., 1997). Innerhalb eines Gewebes können beiden Rezeptoren exprimiert werden. Sie sind jedoch oft auf unterschiedliche Zelltypen verteilt. Zum Beispiel scheint die Expression von ER α im Ovar auf die Zellen der Theca sowie die interstitialen Zellen beschränkt zu sein, während ER β speziell in den Granulosazellen hoch exprimiert wird (Sar und Welch, 1999).

Die Gewebespezifität der Expression von ER α und ER β deutet auf die unterschiedliche Funktion der beiden Subtypen hin. Diese Annahme wird durch die unterschiedlichen Phänotypen der knockout Mäuse für ER α (ER α KO) und ER β (ER β KO) bestätigt. Die ER β KO-Maus zeigt deutlich weniger Fehlbildungen, die nach vorläufigen Daten vor allem auf die Ovarien beschränkt sind und zu verringerter Fertilität führen. Die ER α KO-Maus ist infertil und zeigt neben Fehlbildungen der Ovarien auch eine Hypoplasie des Uterus und eine Unterentwicklung der Brustdrüsen und andere Defekte (Couse et al., 2000). Bei männlichen ER α KO-Mäusen konnte zudem eine gestörte Spermatogenese

sowie Unfruchtbarkeit festgestellt werden. Damit wurde erstmalig nachgewiesen, daß Östrogen auch für die Funktion männlicher Reproduktionsorgane bedeutsam ist (Eddy et al., 1996).

Mittlerweile liegen erste Daten über ER α und ER β doppel KO-Mäuse vor. Bei weiblichen Mäusen ist der Follikel zu einer Testis-ähnlichen Struktur umgewandelt. Auch bei diesen Mäusen sind jedoch nicht alle Östrogen-vermittelten Funktionen ausgefallen, wie durch den Vergleich mit ovariectomierten Mäusen gezeigt werden konnte. Daher wird über die Existenz eines weiteren Östrogenrezeptors spekuliert (Couse et al., 1999).

1.2.4 Varianten der Östrogenrezeptoren

Die mRNA von ER α ist deutlich heterogener als die von anderen Steroidhormonrezeptoren. Die Transkription des ER α -Gens wird von mindestens fünf verschiedenen Promotoren initiiert, die in verschiedenen Geweben in unterschiedlichem Umfang aktiv sind (Grandien, 1996; Grandien et al., 1993; Green et al., 1986; Hayashi et al., 1997; Thompson et al., 1997). Die mRNAs der verschiedenen Promotoren unterscheiden sich nur in der nicht translatierten 5'-Region und kodieren deshalb für das gleiche Protein. ER α mRNA-Varianten die für unterschiedliche Proteine kodieren entstehen zumeist durch alternatives Splicen. Mittlerweile sind mehr als zehn verschiedene Splice-Varianten des Östrogenrezeptors bekannt (Murphy et al., 1997). Neben dem WT-ER α sind Varianten mit Deletionen der Exons 4, 7 und 5 am höchsten exprimiert (Zhang et al., 1996). Die $\Delta 4$ und $\Delta 7$ -Varianten zeigen in Reporter-gen-Studien einen inhibitorischen Effekt auf ER α (Fuqua et al., 1992; Park et al., 1996). Die $\Delta 5$ -Variante ist konstitutiv aktiv (Fuqua et al., 1991) und kann die Aktivität des WT-ER α reprimieren (Desai et al., 1997). Für einige andere Varianten, wie z.B. die $\Delta 3+4$ -Variante, konnte ein positiver Effekt auf ER α nachgewiesen werden (Coutts et al., 1988).

Ebenso wie für ER α sind auch für ER β zahlreiche Varianten beschrieben worden. Für den humanen ER β wurde eine Variante mit zusätzlichen 45 Aminosäuren im N-terminalen Bereich identifiziert (Ogawa et al., 1998). Fast zeitgleich wurde auch bei Ratten eine Variante mit zusätzlichen 64 Aminosäuren am N-Terminus gefunden (ER β 485) (Leygue et al., 1998). Neben den N-terminal-modifizierten Varianten konnten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die cDNA einer 503 Aminosäuren großen Isoform mit einer Insertion in der Ligandenbindungsdomäne klonieren (Chu und Fuller, 1997; Hanstein et al., 1999; Petersen et al., 1998). Bei dieser Variante, die als ER β 2 bezeichnet wird, ist zwischen Exon 5 und 6 ein zusätzliches Miniexon mit einer Größe von 54 bp oder 18 Aminosäuren integriert (Enmark et al., 1997). Anders als die beiden N-terminal verlängerten Varianten zeigt ER β 2 eine 100-fach geringere Östrogenaffinität als ER α und ER β . Bei niedrigen Östrogenkonzentrationen kann ER β 2 als dominant negativer Regulator von ER α und ER β wirken (Maruyama et al.,). Sowohl ER β als auch ER α können mit ER β 2 Heterodimere bilden und an ERE-Elemente binden (Petersen et al., 1998).

Außerdem konnten mehrere ER β -Varianten mit divergenten C-Termini kloniert werden. Diese Varianten entstehen durch alternatives Splicen nach Exon 7 (Moore et al., 1998; Ogawa et al., 1998). Durch den Austausch von Exon 8 fehlen diesen Varianten wichtige Aminosäuren, die an der Ligandenbindung und Transaktivierung beteiligt sind. Es ist daher nicht überraschend, daß für eine dieser Variante, den sogenannte ER β CX („C-terminal exchanged“), weder Ligandenbindung noch Reporter-gen-Aktivität nachgewiesen werden konnte. ER β CX dimerisiert vorrangig mit ER α und zeigt einen dominant negativen Effekt auf die ER α vermittelte Reporter-gen-Aktivierung (Moore et al., 1998).

1.3 Regulation der Transkription durch Östrogenrezeptoren

1.3.1 Regulation von Promotoren mit ERE-Elementen

Die Östrogenrezeptoren ER α und ER β stimulieren die Transkription von Genen die sogenannte estrogen responsive elements (EREs) enthalten. Das Konsensus-ERE ist ein 13 bp großes palindromisches Element mit der Konsensussequenz 5'-AGGTCANNNTGACCT-3'. Der Mechanismus der ERE vermittelten Genregulation ist in Abbildung 1.3.1.1 gezeigt.

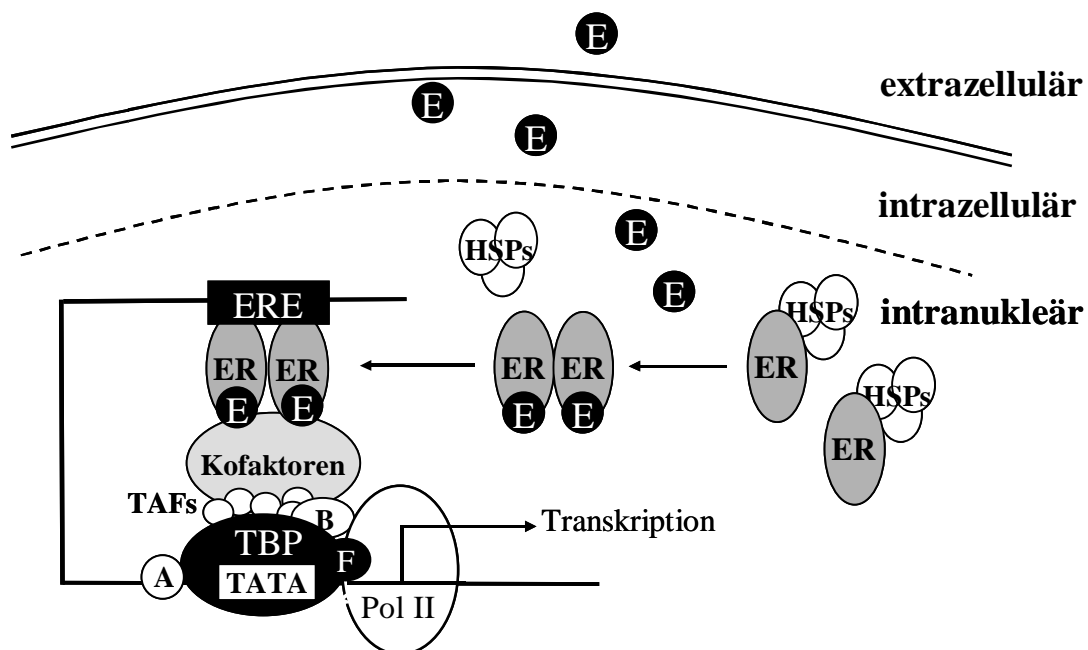


Abbildung 1.3.1.1: Modell für die Genaktivierung durch ER α über ERE-Elementen.

E = Östrogen; ER = Östrogenrezeptor; TBP = TATA binding-Protein; TAFs = tightly-associated-factors; A, B, F = TFIIA,B,F; Pol II = RNA-Polymerase II.

Östrogen zirkuliert frei im Blut oder ist an Plasma-Carrier wie z.B. „sex-hormone binding globulin“ (SHBG) gebunden (ca. 95%). Das ungebundene hydrophobe Östrogen kann vermutlich frei durch Kapillarwand und Zellmembran von Zielzellen diffundieren. Ob Östrogen frei durch das Zytoplasma diffundieren kann, oder durch aktiven Transport in den Zellkern gelangt, ist zur Zeit noch unklar. Vermutlich gelangt das Östrogen durch freie Diffusion durch die Kernporen in den Zellkern.

Sowohl der Ligand-gebundene Östrogenrezeptor, als auch der freie Östrogenrezeptor sind im Zellkern lokalisiert. Solange der Östrogenrezeptor keinen Liganden gebunden hat, ist er an einen Hsp90 Chaperonin-Komplex gebunden (Pratt und Toft, 1997). Der Hsp-Komplex dient vermutlich der Stabilisierung der Rezeptorstruktur. Durch die Bindung von Östrogen an den Östrogenrezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Freisetzung des Hsp-Komplexes bewirkt und eine Dimerisierung des Östrogenrezeptors ermöglicht (Pike et al., 2000). Der aktivierte Östrogenrezeptor kann sowohl Homodimere als auch Heterodimere von ER α und ER β bilden. Das Rezeptordimer kann dann an das ERE-Element im Promotorbereich Östrogen-regulierter Gene binden. Der Östrogenrezeptor kann selbst als Transkriptionsfaktor wirken und/oder andere Transkriptionsfaktoren zum Promotor rekrutieren, welche die Transkription initiieren (Klinge, 2000).

Die Initiation der Transkription ist ein komplexer Vorgang bei dem zahlreiche Proteine am Promotor interagieren. Wenn der Östrogenrezeptor an ein ERE-Element gebunden ist, interagiert er mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und anderen Proteinen inklusive Koaktivatoren, welche die ER-vermittelte Transkriptionsaktivierung verstärken. Es wird angenommen, daß der Östrogenrezeptor und seine Koaktivatoren die Bindung der basalen Transkriptionsfaktoren stabilisieren und dadurch den Aufbau des Initiationskomplexes für die Transkription fördert. Wenn der Initiationskomplex vollständig aufgebaut ist, wird die RNA-Polymerase-II zum Transkriptions-Startpunkt rekrutiert und die Transkription eingeleitet.

Der Initiationskomplex besteht aus den Komponenten TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIF (Greenblatt, 1997; Roeder, 1996). TFIID besteht aus dem „TATA-box binding protein“ und mindestens 8 weiteren sogenannten „tightly associated factors“ (TAFs) mit einem Molekulargewicht von 18 bis 250 kDa (Verijzer und Tjian, 1996). Steroidrezeptoren interagieren mit den basalen Transkriptionsfaktoren TFIIB, TBP und verschiedenen TAFs von TFIID (Keightley, 1998). ER α interagiert zudem direkt mit TFIIB (Ing et al., 1992) und mit TBP, wobei die Interaktion sowohl mit AF1 als auch mit AF2 erfolgt (Sadovsky et al., 1995). Außerdem interagiert die Ligandenbindungsdomäne von ER α ligandenabhängig mit TFII30. Es konnte nachgewiesen werden, daß diese Interaktionen Voraussetzung für die ER α vermittelte Transkriptionsaktivierung ist (Jacq et al., 1994). Eine vergleichbare Interaktion konnte auch mit TAFII28 nachgewiesen werden (May, 1996). TAFII135 scheint hingegen die Transkriptionsaktivierung durch ER α nicht zu beeinflussen, obwohl ein solcher Effekt für andere Steroidrezeptoren (TR, RAR, VDR) nachgewiesen werden konnte.

1.3.2 Regulation von Promotoren ohne ERE-Elemente

Genregulation durch Östrogenrezeptoren ist nicht auf Promotoren beschränkt die ERE-Elemente enthalten. Daher müssen neben der ERE-vermittelten Genregulation alternative Mechanismen der Genregulation existieren. Tatsächlich konnte für den Östrogenrezeptor und andere Steroidrezeptoren die Regulation von Promotoren mit alternativen responsiven Elementen gezeigt werden (Gottlicher et al., 1998). So vermittelt ER α die Regulation von Promotoren die Bindungsstellen für das AP-1-Protein enthalten, welches aus den Transkriptionsfaktoren Fos und Jun besteht (Gaub et al., 1996; Paech et al., 1997; Phillips et al., 1993; Rochefort, 1995; Tora et al., 1988; Umayahara et al., 1994; Webb et al., 1995; Webb et al., 1999). Die Regulation des Qino-Reduktase Gens ist von einem „elektrophile response element“ abhängig, das durch ATF-Transkriptionsfaktoren gebunden wird, die mit Jun dimersieren können (Montano und Katzenellenbogen, 1997) und der Promotor des Cyclin-D-Gens wird von ER α über ein CRE-ähnliches Element reguliert, das ebenfalls ATF/Jun binden kann (Geum et al., 1997).

Der Östrogenrezeptor modifiziert aber auch die Aktivität von Promotoren, die durch andere Transkriptionsfaktoren reguliert werden. So wird der Promotor des E2F-Gens über eine GC reiche Sequenz in Kombination mit einer SP1-Bindungsstelle reguliert (Wang et al., 1999) Außerdem konnten in einigen Promotoren Sequenzen identifiziert werden, die eine Östrogen-abhängige Regulation vermitteln, für die aber bisher noch keine Transkriptionsfaktoren bekannt sind (Dubrik und Shiu, 1992; Elgort et al., 1996; Liu et al., 1994; Sukovich et al., 1994; Yang et al., 1996). Bei keinem dieser Promotoren konnte eine direkte Interaktion des Östrogenrezeptors mit der Promotor-DNA nachgewiesen werden. Daher wird angenommen, daß der ER über Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren an den Promotor bindet.

Während die Genregulation über ERE-Elemente bereits bis in die molekularen Details untersucht ist, ist die Regulation über „crosstalk“ mit andern Transkriptionsfaktoren bisher kaum charakterisiert. Am besten untersucht ist die Interaktion von ER α und AP-1 (Kushner et al., 2000). In Reporter-gen-Studien konnte in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie sowohl Repression als auch Aktivierung von Promotoren mit AP-1-Elementen nachgewiesen werden (Doucas et al., 1991; Shemshedini et al., 1991; Tzukerman et al., 1990). Wie der Östrogenrezeptor die Aktivität des AP-1-Proteins modifiziert ist bisher noch unklar. *In vitro* konnte eine direkte Interaktion des Östrogenrezeptors mit Jun aber nicht mit Fos nachgewiesen werden (Webb et al., 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, daß in den Proteinkomplex am AP-1-Element auch Koaktivatoren der Östrogenrezeptoren, wie SRC-1 und CBP integriert sind (Kamei et al., 1996; Torchia et al., 1997). Die Repression von Promotoren mit AP-1-Elementen ist möglicherweise auf eine Titration dieser Transkriptionfaktoren durch den Östrogenrezeptor zurückzuführen (Kamei et al., 1996; Lee et al., 1998). Östrogen kann den AP-1-Komplex nur über ER α stimulieren, über ER β wirkt Östrogen reprimierend auf den AP-1-Komplex (Paech et al., 1997).

Obwohl die relative Bedeutung der Genregulation über heterologe responsive Elemente zur Zeit noch unklar ist, könnte sie ähnlich bedeutsam sein wie die Genregulation über ERE-Elemente. In Zelllinien in denen AP-1 durch ER α reprimiert wird, wird auch die Proliferation durch ER α inhibiert. Bei Zelllinien deren Proliferation durch ER α stimuliert wird, wird auch AP-1 stimuliert (Philips et al., 1998). Daher wird angenommen, daß die Interaktion von ER α und AP-1 in die Kontrolle der Proliferation eingebunden ist.

Da die meisten natürlichen Promotoren Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren enthalten, können die Östrogenrezeptoren z.T. gegenläufige Effekte über diese Elemente ausüben (z.B. ER β über ERE und AP-1). Die Transkriptionsrate ist daher das Resultat aus stimulierenden und reprimierenden Einflüssen, die über verschiedene Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren vermittelt werden. Demnach kann die unterschiedliche Expression von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren die gewebespezifischen Effekte von Östrogenen und Antiöstrogenen erklären (Gottlicher et al., 1998; Graham et al., 2000).

1.4 Koaktivatoren und Korepressoren der Östrogenrezeptoren

Für ER α konnte *in vitro* die Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen gezeigt werden. Diese Interaktionen haben oft erhebliche Konsequenzen auf die ER α vermittelte Transkription. In den letzten 5 Jahren konnten die Existenz von mindestens 19 sogenannten Koaktivatoren nachgewiesen werden (Klinge, 2000). Diese werden zum Teil auch als „receptor associated proteins“ (RAPs) oder „receptor interacting proteins“ (RIPs) bezeichnet, obwohl nicht alle Proteine die mit dem Östrogenrezeptor interagieren als Koaktivatoren wirken. Koaktivatoren sind per Definition Proteine, die direkt mit dem Steroidrezeptor interagieren und dadurch die Transkription verstärken (Horwitz et al., 1996). Koaktivatoren können die Transkription von steroidregulierten Genen auf verschiedene Weise beeinflussen: (1) Sie integrieren den Transaktivierungskomplex in die basale Transkriptionsmaschinerie und könne so spezifisch die Transaktivierung durch Steroidrezeptoren verstärken; (2) Sie integrieren zusätzliche Transkriptionsfaktoren in die basale Transkriptionsmaschinerie; (3) Sie besitzen oftmals eine Histonacetyl-Transferase (HAT), welche die Bindung der Histone modifiziert und dadurch die Transaktivierung verbessert.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Überexpression eines Steroidrezeptors die Transkription durch einen Anderen inhibieren kann (Meyer et al., 1989). Daher wird angenommen, daß die Steroidrezeptoren *in vivo* um eine begrenzte Menge an Koaktivatoren konkurrieren. Am besten untersucht sind die 160 kDa großen Koaktivatoren der SRC-1-Familie (auch p160-Koaktivatoren) sowie die 300 kDa großen Koaktivatoren p300 und CBP (Klinge, 2000).

1.4.1 Die p160 Familie der Koaktivatoren

Die Interaktion von ER α mit den Mitgliedern der p160-Koaktivatoren Familie, SRC-1 (Halachmi et al., 1994; Onate et al., 1995), TIF2 (Voegel et al., 1996) und AIB1 (Anzick et al., 1997) wird durch die Wechselwirkung von AF2 mit der sogenannte NID (nuclear receptor interaction domain) Domäne vermittelt. Diese besteht aus einem 5 Aminosäuren langen Leucin-reichen Motiv mit der Sequenz LXXLL, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann (McKenna et al., 1999). Durch Mutationsanalysen von ER α konnte gezeigt werden, daß für die Erkennung der NID die Helices 3,4,5 und 12 der Ligandenbindungsdomäne verantwortlich sind (Shiau et al., 1998). Obwohl alle drei Koaktivatoren einen großen Grad von Homologie zueinander haben, konnte nachgewiesen werden, daß sie unterschiedliche Funktionen haben.

Der erste Koaktivator für den eine direkte Interaktion mit ER α gezeigt wurde, war der Steroidrezeptor Koaktivator SRC-1 (ERAP-160, NcoA1) (Halachmi et al., 1994; Onate et al., 1995). In Reportergen Studien konnte SRC-1 die Transaktivierung durch ER α und ER β verbessern. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) von ER α bindet die NDI Sequenzen von SRC-1 nur nach Bindung von Östrogen, Tamoxifen vermitteln keine SRC-1 Bindung an die LBD. SRC-1 verstärkt die Östrogen-vermittelte Transkription über ER α und ER β und verbessert die Interaktion zwischen der N- und der C-terminalen Domäne von ER α . Es wird daher angenommen, daß SRC-1 die Integration von AF1 und AF2 von ER α ermöglicht und damit die Aktivität von ER α steigert. Obwohl SRC-1 nach TAM-Bindung nicht an die AF2 gebunden wird, konnte gezeigt werden, daß SRC-1 die TAM induzierte Aktivität von ERE-Reportergenen über ER α steigern kann (Smith et al., 1997). Es ist daher nicht überraschend, daß eine direkte Interaktion von SRC-1 mit AF1 nachgewiesen werden konnte, welche *in vivo* vermutlich zum agonistischen Effekt von 4-OHT beiträgt (Webb et al., 1998). Wie aufgrund der Homologie von ER α und ER β zu erwarten war, bindet SRC-1 auch an die LBD von ER β (Tremblay et al., 1997). Die niedrig konservierte AF1 scheint hingegen bei ER β keine Bindungsstelle für SRC-1 zu enthalten (Cowley und Parker, 1999). Durch Mutationsanalysen der LBD von ER α und ER β konnte gezeigt werden, daß die Interaktion mit Kofaktoren bei beiden Rezeptoren über Helix 12 der LBD erfolgt (Cowley und Parker, 1999). SRC-1 stimuliert die Östrogen-vermittelte Transkription sowohl durch Homodimere von ER α oder ER β , als auch über ER α -ER β -Heterodimere (Tremblay et al., 1999).

Die Histonacetyltransferase-Funktion (HAT) von SRC-1 befindet sich in der C-terminalen Region und ist spezifisch für die Histone H3 und H4 (Spencer et al., 1997). Die Acetylierung dieser Histone führt zu einer schwächeren DNA-Bindung, was den Aufbau des Initiationskomplexes fördert und damit die Transkriptionsrate steigert. Neben seiner Interaktion mit Steroidrezeptoren interagiert SRC-1 mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie z.B. Fos und Jun (Lee et al., 1998) und den basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFIID (Ikeda et al., 1999). Daher wird angenommen, daß SRC-1 als

Verbindungsfaktor wirkt, der den ER α -ERE-Komplex und/oder den ER α -AP-1-Komplex mit dem RNA-Polymerase II-Initiationskomplex zu einem Gesamtkomplex verbindet (Takeshita et al., 1996).

Der Transkriptionsfaktor TIF2 (SRC-2/GRIP-1/NcoA-2) (Voegle et al., 1996; Hong et al., 1996) stimuliert ebenso wie SRC-1 die ligandenabhängige Transaktivierung durch den AR, ER α , PR, GR, TR, RXR, RAR, und VDR. Wie SRC-1 bindet TIF2 die AF2 von ER α und ER β nur nach Bindung von Östrogen, aber nicht ohne Ligand oder nach Bindung von Tamoxifen (Cowley und Parker, 1999). Ebenfalls konnte eine Interaktion mit AF1 von ER α nachgewiesen werden (Webb et al., 1998). Die N-terminale A/B-Domäne von ER β bindet nicht an TIF2 (Webb et al., 1998). Während die Transaktivierung durch ER α von TIF2 stark stimuliert wird, wird die ER β vermittelte Transaktivierung nur in geringem Umfang stimuliert (Webb et al., 1998). Vermutlich wird ER α durch TIF2 stärker stimuliert, weil die gleichzeitige Bindung von AF1 und AF2 eine Integration der beiden Aktivierungsfunktionen ermöglicht.

Der Koaktivator AIB1 (SRC3;ACTR;RAC3;TRAM1;p/Cip) (Anzick et al., 1997; Chen et al., 1997; Li et al., 1997; Takeshita et al., 1997; Torchia et al., 1997) zeigt große Homologie zu SRC-1 und GRIP2. Durch Kotransfektion von ER α und GRIP2 konnte eine Steigerung der Östrogen-vermittelten ERE-Reportergen-Aktivität erzielt werden (Anzick et al., 1997). Die ER β vermittelte Transkription konnte hingegen nicht gesteigert werden (Suen et al., 1998). Damit ist AIB1 der erste und bislang einzige bekannte Kofaktor der selektiv nur einen der beiden Östrogenrezeptoren aktiviert.

Wie für die anderen Mitglieder der p160 Familie ist auch für AIB1 eine HAT-Aktivität nachgewiesen worden (Suen et al., 1998). Außerdem wird AIB1 selbst durch p300/CBP acetyliert. Diese Acetylierung wird in MCF7-Zellen durch Östrogen gefördert. Daher wird angenommen, daß für die Acetylierung ein Komplex aus ER α -p300/CBP und AIB1 verantwortlich ist (Chen et al., 1999). Die Acetylierung von AIB1 schwächt *in vitro* die Interaktion von AIB1 und ER α ab. Diese Daten lassen darauf schließen, daß die hormoninduzierte Transkription ein dynamischer Prozess ist, der durch Acetylierungen von Histonen stimuliert und Acetylierung von Kofaktoren reprimiert werden kann (Chen et al., 1999).

Für AIB1 konnte eine Überexpression in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien und in 64% der primären Mammakarzinome nachgewiesen werden (Anzick et al., 1997). In einer großen Studie mit 1157 Mammakarzinomen und 122 Ovarialkarzinomen konnte eine Überexpression jedoch nur bei 4,8% der Mamma- und bei 7,4% der Ovarialkarzinome gefunden werden. In den Mammakarzinomen zeigte sich jedoch eine Korrelation mit ER α , PR und der Tumorgroße (Bautista et al., 1998). Die Bedeutung von AIB1 als Marker für Östrogen-sensible Mamma- und Ovarialkarzinome ist damit weiterhin unklar.

1.4.2 Die p300 Koaktivatoren

Die nahe verwandten Koaktivatoren p300 und CREB-binding protein (CBP), sind anders als die p160 Familie der Koaktivatoren nicht spezifisch für Steroidrezeptoren, sondern interagieren außerdem mit einer Vielzahl von anderen Faktoren, wie z.B. p53 (Gu und Roeder, 1997; Gu und Shi, 1997) und NF κ B (Na et al., 1998; Perkins et al., 1997). Sie werden auch als Kointegratoren bezeichnet, da sie Signale verschiedener Signaltransduktionswege integrieren. CBP und p300 binden selbst nicht an DNA, werden aber durch sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren zum Promotor rekrutiert (Yang et al., 1996). p300 interagiert nicht nur mit dem Östrogenrezeptor (Hanstein et al., 1996) sondern auch mit SRC-1 (Jenster et al., 1997), TIF2 (Voegel et al., 1998) und AIB1 (Torchia et al., 1997). In transient transfizierten Zellen steigern SRC-1 und CBP synergistisch die Stimulation durch ER α /E2 (Jenster et al., 1997; Smith et al., 1996). In Zellextrakten ist CBP mit dem RNA-Polymerase-II Komplex assoziiert. Daher wird angenommen, daß der Komplex aus Steroidrezeptor, CBP und anderen Koaktivatoren den Aufbau des RNA-PolymeraseII Intitiationskomplexes fördert (Kee et al., 1996). CBP war der erste Koaktivator für den eine HAT-Aktivität nachgewiesen wurde (Ogryzko et al., 1996). Die beiden Koaktivatoren acetylieren nicht nur verschiedenen Histone (Bannister und Kouzarides, 1996), sondern auch viele Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53 (Gu und Roeder, 1997; Gu und Shi, 1997) und AIB1 (Chen et al., 1999), sowie Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie wie z.B. TFIIE β und TFIIF (Imhof et al., 1997). Die Acetylierung der nukleären Proteine führt zumeist zu einer Steigerung der ER α -vermittelten Transaktivierung, kann aber auch - wie für AIB gezeigt wurde - reprimierend wirken.

1.4.3 Korepressoren

Während die Interaktion von Steroidrezeptoren mit Koaktivatoren bereits sehr gut untersucht ist, liegen zu der Interaktion von Steroidrezeptoren mit Korepressoren vergleichsweise wenig Daten vor. Die beiden Korepressoren NCoR und SMRT wurden ursprünglich als Repressoren von Klasse I Rezeptoren identifiziert. An diese sind beide Korepressoren gebunden, solange diese keinen Ligand gebunden haben (Horlein et al., 1995; Horwitz et al., 1996; Kurokawa et al., 1995).

Beide Korepressoren reduzieren die agonistische Aktivität von Tamoxifen aber nicht die von Östradiol (Glass und Rosenfeld, 2000; McLenna et al., 1999). Wenn Tamoxifen an ER α gebunden, ist kann dieser direkt mit SMRT und NCoR interagieren. Ohne Ligand oder mit Östrogen als Ligand werden beide Korepressoren nicht von ER α gebunden (Lavinsky et al., 1998).

Im Gegensatz zu den Koaktivatoren besitzen die beiden Korepressoren keine HAT-Aktivität sondern eine Histon-Deacetylase (HDAC). Es wird angenommen, daß eine Deacetylierung eine starke Kondensierung des Chromatins bewirkt, die den Transkriptionsfaktoren den Zugang zu ihren Bindungsstellen erschwert und damit die Trankriptionsrate senkt (Alland et al., 1997; Heinzl et al., 1997; Nagy et al., 1998).

Durch Mikroinjektion von Antikörpern gegen SMRT und NCoR, in die Östrogen-abhängige Mammakarzinomzelllinie MCF7, wird das antagonistische Tamoxifen zu einem Agonisten konvertiert (Lavinsky et al., 1998). Diese Daten deuten darauf hin, daß die Interaktion von ER α mit Korepressoren für die antagonistische Wirkung von Tamoxifen benötigt wird. Möglicherweise ist eine niedrige Expression von NCoR, SMART und anderen Korepressoren für den antagonistischen Effekt von Tamoxifen verantwortlich, der in manchen Geweben beobachtet werden kann. Ob SMRT und N-CoR unterschiedliche Funktionen haben und ob sie auch mit ER β interagieren können, ist zur Zeit noch unklar.

1.5 Nichtgenomische Östrogen-Effekte

Die Effekte von Östrogenen und SERMs werden zumeist durch Interaktion mit den nukleären Rezeptoren und die nachfolgenden Modifikationen der Transkriptionsmaschinerie erklärt. Einige Effekte von Steroidhormonen treten jedoch bereits nach wenigen Sekunden auf und lassen sich daher nicht über eine Veränderung der Transkriptionsrate erklären. Zahlreiche experimentelle Belege für solche „schnellen“ Effekte sind gefunden worden: In myometrialen Zellen bewirkt Östrogen einen schnellen Calcium-Influx (Pietras und Szego, 1975). Schnelle Effekte von 17 β - und 17 α -Estradiol konnten auch in neuronalen Zellen (Mermelstein et al., 1996), Granulosazellen (Morley et al., 1992) und anderen Geweben nachgewiesen werden (Wehling et al., 1995). In patch-clamp-Experimenten konnte gezeigt werden, daß Östrogen eine schnelle Öffnung von Na⁺-Kanälen verursacht (Valverde et al., 1999). Östrogen bewirkt zudem eine Aktivierung der Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAP-Kinase) mit nachfolgender Aktivierung der NO-Synthetase in vasculären Muskelzellen (Chen et al., 1999).

Es wird angenommen, daß diese Effekte über membranständige Östrogenrezeptoren vermittelt werden. Unter Verwendung spezifischer Antikörper konnten Membran-Bindungsstellen für Östrogen identifiziert werden (Norfleet et al., 1999). Möglicherweise werden der nukleäre und der Membran-Östrogenrezeptor aus dem gleichen Transkript gebildet (Razandi et al., 1999).

Die Bindung von Östrogen an den membranständigen ER führt zur Aktivierung eines G-Proteins, welches dann in eine α - und in eine $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert die Phospholipase c, welche Phosphatidylinositol-Pyrophosphate zu Diacylglycerol und Inositol Triphosphat umsetzt. Dies bewirkt in Osteoblasten den Efflux von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Le Mellay et al., 1999).

In MCF7 Mammakarzinom-Zelllinien ist der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration mit einer Aktivierung der MAP-Kinase verbunden (Improta-Brears et al., 1999; Lobenhofer et al., 2000). MAP Kinasen sind Serin/Threonin Kinasen, die Signale von verschiedenen Membranrezeptoren zu intrazellulären Targets wie Transkriptionsfaktoren, Cytoskelett-Proteine und Enzymen weiterleiten. Die Aktivierung der MAP-Kinasen führt über eine sequentielle Aktivierung von Ras, Raf und der

Mitogen-Activated-Kinase (MEK) zur Proliferation (Collins und Webb, 1999). Welche Bedeutung die Membran-Rezeptoren für Östrogen im Gesamtkontext der Östrogenwirkung haben, ist zur Zeit noch unklar.

1.6 Östrogenwirkung in der Karzinogenese

Die ersten Belege für einen Zusammenhang zwischen Östrogen und Brustkrebs wurde im Jahre 1896 von dem britischen Chirurgen Beatson erbracht (Beatson, 1896). Dieser konnte zeigen, daß die Entfernung der Ovarien bei prämenopausalen Frauen zu einer Regression von fortgeschrittenen Mammakarzinomen führen kann (Beatson, 1896). Bereits wenige Jahre später wurde eine Studie veröffentlicht, die zeigte, daß es bei ca. 1/3 aller Mammakarzinom-Patientinnen nach Oophorektomie zu einer Tumor-Regression kommt (Boyd, 1900). Steroidhormone waren zu dieser Zeit noch nicht bekannt. Der erste Beweis für deren Existenz in der Follikelflüssigkeit und ihr karzinogenes Potential wurde erst 30 Jahre später erbracht (Lacassagne, 1932).

Durch Tierversuche konnte der Einfluß von natürlichen und synthetischen Östrogenen auf die Entstehung und Progression von malignen und benignen Karzinomen mittlerweile eindeutig belegt werden (Lupulescu, 1993). Dabei scheinen die Steroidhormone eher mitogene Koaktivatoren als Tumorpromotoren zu sein (Beckmann et al., 1997; Cohen und Ellwein, 1991; Devilee und Cornelisse, 1996).

Die spezifische Rolle der Steroidhormone in der Progression von Mamma- und Endometriumkarzinomen ist noch immer weitgehend unverstanden. Unter physiologischen Bedingungen steuert Östrogen die Proliferation und Apoptose des Drüsenepithels der Mamma und des Endometriums, indem es die Expression einer Vielzahl von Genen in den Östrogen-abhängigen Epithelzellen reguliert. (Katzenellenbogen, 1996). Dabei stehen die Östrogenrezeptoren in Wechselwirkung mit anderen Regulationssystemen der Proliferations- und Zellzyklus-Kontrolle. Es konnten Wechselwirkungen mit Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, TGF α , TGF β , PDGF, IGF-I und IGF-II), Protooncogenen (z.B. Fos, Jun, myc, int-2, erbb2, ras), Tumorsuppressorgenen (z.B. TP53, BRCA1, MST1, HIC, NME1) Zellzyklus-Regulatoren (z.B. Cyclinen, CDKs, p16, p21), Telomerase, Mutatorgenen (z.B. MSH2, MLH1, PMS1/2) und Apoptose-Genen (CD95, bcl2) gezeigt werden (Ciocca und Fanelli, 1997; Lemieux und Fuqua, 1996; Shayamala, 1997; Sutherland et al., 1998). Fehlfunktionen in diesen Regulationssystemen sind wichtige Schritte in der Mehrschritt-Karzinogenese von Mamma- und Endometriumkarzinomen. Vermutlich führen diese Defekte zu einer unphysiologischen Östrogen-induzierten Proliferation und zu einem Verlust der Östrogen-induzierten Apoptose (Beckmann et al., 1997; Dickson und Stancel, 2000).

Daher sind synthetische Antiöstrogene, wie z.B. das Tamoxifen, welches die Interaktion von Hormonen und Steroidrezeptoren blockieren, effektive Therapeutika zur Behandlung hormonabhängiger Tumore (Jordan, 1998).

1.7 Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)

Brustkrebs ist in der westlichen Welt die häufigste Todesursache bei Frauen im Alter von 35-50 Jahren. In Deutschland erkrankt durchschnittlich eine von zehn Frauen bis zu ihrem 85. Lebensjahr an Brustkrebs (Garfinkel et al., 1994). Da ein Großteil der Mammakarzinome Östrogen-abhängig ist, haben Antiöstrogene, wie z.B. Tamoxifen (TAM), eine große klinische Bedeutung in der Onkologie (Osborne, 1998).

Antiöstrogene wirken als kompetitive Inhibitoren der Östrogenbindung. Die physiologische Wirkung der verschiedenen Antiöstrogene zeigt eine ausgeprägte Gewebespezifität. So wirkt TAM in der Brust als Östrogen-Antagonist und im Endometrium als Agonist, während Raloxifen (RLX) in beiden Geweben als Antagonist wirkt (Jordan, 1998). Daher werden Antiöstrogene mit gewebespezifischer Wirkung auch als „Selective Estrogen Receptor Modulators“ (SERMs) bezeichnet (Abbildung 1.7.1.1). Andere Östrogen-Antagonisten können die Dimerisierung der Östrogenrezeptoren inhibieren und wirken daher als reine Östrogen-Antagonisten und werden deshalb nicht zu den SERMs gezählt. Zur Behandlung des Mammakarzinoms ist zur Zeit nur Tamoxifen zugelassen.

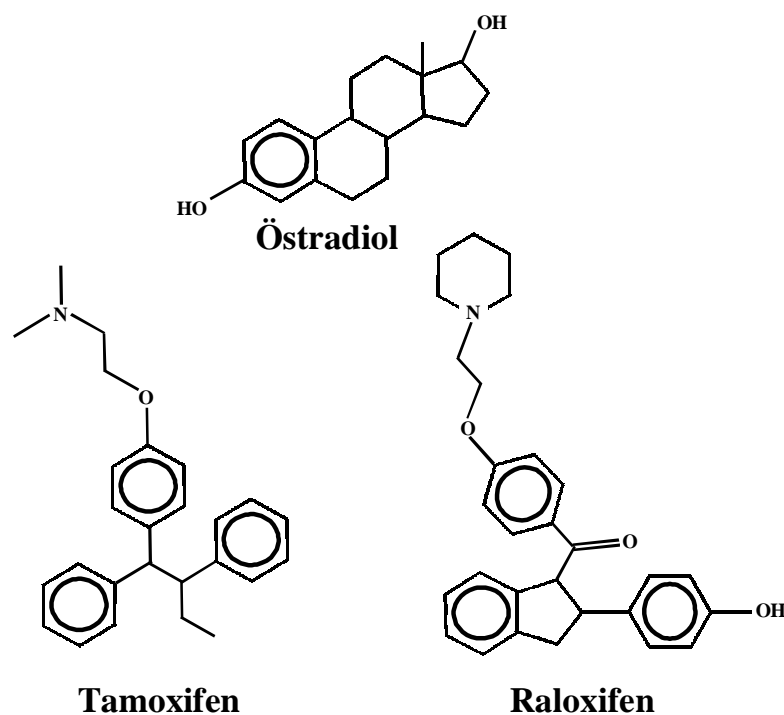


Abbildung 1.7.1.1: Der natürliche Ligand Östrogen und die synthetischen SERMs Raloxifen und Tamoxifen.

Die Expression von ERs und PRs in Zellen von Mamma- und Endometriumkarzinomen ist ein Indiz für deren Hormonabhängigkeit. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß etwa 60% aller Patientinnen mit einem fortgeschrittenen ER α -positiven Mammakarzinom, von einer Therapie mit Tamoxifen profitieren. Eine langfristige Therapie mit TAM kann jedoch zu TAM-resistenten Tumoren führen (EBCT-Group, 1992; EBCT-Group, 1996; EBCT-Group, 1998). In *in vitro* Studien konnte eine TAM resistente Zelllinie durch stabile Transfektion mit ER α in eine TAM sensitive Zelllinie verwandelt werden. Während der Progression werden die meisten Tumore jedoch TAM-resistent, ohne den ER zu verlieren (Devilee und Cornelisse, 1996; 1998). *In vivo* kann TAM das Wachstum von TAM-resistenten ER-positiven Tumoren sogar fördern (Osborne und Fuqua, 1994; Umayahara et al., 1994). In Mäusen steigert die Langzeitapplikation von TAM das Wachstum von ER α positiven Mammakarzinom-Zellen. RLX zeigt dieses Phänomen nicht (Gottardis und Jordan, 1988). Steroidhormon-Antagonisten mit anderen Wirkmechanismen (z.B. Aromatase-Inhibitoren) können eine Tumor-Reduktion bei TAM-resistenten Tumoren bewirken. Verschiedenen Mechanismen sind als Ursache für die primäre und sekundäre (Anti) Hormonresistenz postuliert worden: (1) Verlust der Expression des ER oder Selektion von ER negativen Zelllinien; (2) Funktionsverlust des ER durch Mutationen oder alternatives Splicen; (3) Veränderte Expression von ER Subtypen (5) Veränderte Expression, Verlust oder Mutation von Kofaktoren (Beckmann et al., 1998; Brzozowski et al., 1997) Obwohl fast 60% aller Endometriumkarzinome ER α exprimieren, bewirkt TAM nur bei 15% aller Patientinnen eine Tumorreduktion. TAM scheint sogar als Induktor der Endometrium-Karzinogenese zu wirken (Fisher et al., 1998). Im Gegensatz zu TAM hat RLX keinen stimulierenden Effekt auf Endometrium-Zellen. In histologischen Untersuchungen konnte sogar eine Regression festgestellt werden (Delmas et al., 1997).

Die Ursachen für die gewebespezifische Wirkung verschiedener SERMs sind noch nicht vollständig verstanden. Auf Promotoren mit ERE-Elementen wirkt TAM als partieller Agonist/Antagonist von ER α und als reiner Antagonist von ER β (Hall und McDonnell, 1999). Eine Rezeptor-spezifische Wirkung von TAM und RLX konnte auch für Promotoren mit AP-1-Elementen nachgewiesen werden (Jones et al., 1999; Paech et al., 1997). Auf Promotoren mit AP-1-Elementen wirken TAM und RLX über ER α reprimierend, über ER β hingegen stimulierend (Paech et al., 1997). Die gewebespezifischen Unterschiede im Expressionsniveau von ER α und ER β können daher die gewebespezifische Wirkung der SERMs zumindest teilweise erklären (Gustafsson, 1999).

Unterschiedliche Liganden können zudem spezifische Rezeptor-Konformationen induzieren (Brzozowski et al., 1997). Es konnte nachgewiesen werden, daß dies zur Bindung von Ligand-spezifischen Kofaktoren führen kann. Zum Beispiel bewirkt TAM, aber nicht Östrogen, eine Bindung der Korepressoren NCoR und SMART an die N-terminale Domäne von ER α . Eine Inaktivierung dieser Korepressoren kann die agonistische Wirkung von TAM verstärken (Lavinsky et al., 1998). Vermutlich bestimmt die gewebespezifische Expression solcher Ligand-spezifischen Kofaktoren die Gewebespezifität der SERMs.

2 Problemstellung

Die Östrogenrezeptor-vermittelte Genregulation über EREs ist mittlerweile sehr genau verstanden (1.3.1). Einige der Östrogen-vermittelten Effekte lassen sich mit diesem Modell jedoch nicht befriedigend erklären. Insbesondere ist unklar, auf welche Weise die für manche Gene beobachtete Repression der Genexpression durch Östrogen erfolgt. Außerdem können die gewebespezifischen Effekte des Östrogens und der Antiöstrogene mit diesem Modell nur unzureichend erklärt werden. Daher wurde die Existenz von alternativen Regulationsmechanismen postuliert. Mittlerweile konnten eine Reihe von Genen identifiziert werden, die Östrogen-abhängig reguliert werden, aber keine ERE-Elemente enthalten (1.3.2). Möglicherweise ist die Regulation über alternative responsive Elemente wie z.B. AP-1-Elemente sogar bedeutsamer als die Regulation über EREs. So konnte in humanen Tumor-Zelllinien bisher kein einziges Gen identifiziert werden, welches über ein voll konserviertes ERE-Element reguliert wird. Die mäßig konservierten EREs, die in einigen Promotoren gefunden werden konnten, sind in den meisten Fällen nicht funktionell (May und Westley, 1995).

Östrogen spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese von gynäkologischen Malignomen (Flötotto et al., 2001). Daher ist ein besseres Verständnis der Genregulation über alternative responsive Elemente ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung von Östrogen-abhängigen Tumoren. Die Mechanismen die der nicht ERE-vermittelten Genregulation zugrunde liegen sind jedoch noch immer weitestgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die folgenden Aspekte der Genregulation über alternative responsive Elemente untersucht werden:

- 1) Wie unterscheiden sich die Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ bezüglich der Regulation über alternative responsive Elemente ? Welche Aktivierungsfunktionen der Östrogenrezeptoren sind an der Regulation über alternative Elemente beteiligt ?
- 2) Welche Bedeutung haben Kofaktoren bei der Regulation von Promotoren mit alternativen ERs ? Kann die gewebespezifische Wirkung der SERMs durch die Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren erklärt werden ? Können Kofaktoren die Regulation über alternative responsive Elemente qualitativ und/oder quantitativ modifizieren ?
- 3) Binden die Östrogenrezeptoren direkt an Promotor-gebundene Transkriptionsfaktoren ?
- 4) Welche Rolle spielen Splice-Varianten der Östrogenrezeptoren bei der Regulation über alternative Elemente ?

3 Material und Methoden

3.1 Mikroorganismen

Es wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt:

Organismus	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F⁺pro ABlac ZΔM15 TN10 (Tet^r)]</i>	Stratagene

Tabelle 3.1: Mikroorganismen

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Plasmide

Plasmidkarten der verwendeten Plasmide sind im Anhang zu finden. Plasmidkarten von selbst konstruierten Plasmiden sowie von Reporterplasmiden sind im Ergebnissteil zu finden.

3.2.2 Primer

Es wurden die folgenden Primer eingesetzt:

Primer	Größe (b)	Sequenz	Verwendungszweck
ERBVP16R	37	5'GGGGGGGTCGACTTA TGACATTCTACAGTCCT GCTGT 3'	Konstruktion von VP16ERBeta und Beta2 (sense)
ERAVP16U	35	3'GGGGGGGTCGACTTA TGACCATGACCCTCACAC CC 5'	Konstruktion von VP16ERAalpha (sense)
ERXVP16R	33	5'GGGGGGGCTAGCCA GTCGAGGCTGTAGAAG GCA 3'	Konstruktion von VP16ERAalpha, Beta und Beta2 (antisense)
AP-1EXUNI	35	5'GGGGCTGCAGAGTA ATAGAACTCTTGCTTGC TTG 3'	Eliminierung der AP-1 Sites aus pGL2-Basic
AP-1EXREV	30	5'GGGGGCTGCAGGGA AAGTCCTTGGGGTCTTC 3'	Eliminierung der AP-1 Sites aus pGL2-Basic und seinen Derivaten
PP-647PR	30	5'GAAGATCTCTGTTCA ACATCTCTACTGAGG	Klonierung des proximalen PR-Promotors (sense)
PP+30PR	28	5'CCCAAGCTTGCTTAC CCCATTAGTGAC3'	Klonierung des proximalen PR-Promotors (antisense)
DP+438PR	25	5'GAAAGATCTTTGCGC TCCCCACTTGC 3'	Klonierung des distalen PR-Promotors (sense)
DP+1084PR	28	5'CCCAAGCTTCCAAGA CACTGTCCAGCAG 3'	Klonierung des distalen PR-Promotors (antisense)

pGLUNI	47	5' CGACGTTGTAAACT ACGGCCAGTTGTATCTT ATGGTACTGTA ACTG	Sequenzierung von Promotoren in pGL2-Basic Derivaten (sense)
pGLRev	41	CAGGAAACAGCTATGA CCCTTTATGTTTTTGGC GTCTTCCA	Sequenzierung von Promotoren in pGL2-Basic Derivaten (antisense)
β -Actin5	20	5'AGAGATGGCCACGGC TGCTT 3'	Kontrolle auf Kontaminationen mit genomischer DNA (sense)
β -Actin3	20	5'ATTTGCGGTGGACGA TGGAG 3'	PCR Kontrolle auf Kontaminationen mit genomischer DNA (antisense)
GAPDH195S	18	5'CCATGGAGAAGGCTG GGG 3'	Amplifikation von GAPDH als interner Standard bei der qRT-PCR (sense)
GAPDH195A	20	5'CAAAGTTGTCATGGA TGACC 3'	Amplifikation von GAPDH als interner Standard bei der qRT-PCR (antisense)
ERB2165	19	5'ATTGACCACCCCGGC AAGC 3'	Nachweis von ER β 2
BH9		5'GATCATGGCCTTGAC ACAGAG 3'	Nachweis von ER β 2

Tabelle 3.2: Primer. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind in der Primersequenz durch Fettdruck hervorgehoben.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zelllinien

Die benutzten, von „American Type Culture Collection“ (ATCC) bezogenen Zelllinien sind folgendermaßen charakterisiert [Angabe der Kulturbedingungen bezogen auf Normalbedingungen im „Vollmedium“]

Ishikawa

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Kluge (Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde 1985 von Nishida et. al. Aus einem gut differenzierten Adenokarzinom des Endometriums etabliert.

[DMEM-F12, 10 % (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotika/L-Glutamin-Lösung, 15 mM HEPES]

MCF7 (ATCC HTB 22)

Diese Zelllinie wurde von H.D. Soule durch Punktion nach einem Pleuraerguß einer 69 Jahre alten Frau mit Mammakarzinom isoliert (Soule et al., 1973).

[DMEM, 10% (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotika/L-Glutamin-Lösung, MEM 100 x Vitaminlösung]

HeLa

HeLa war die erste aneuploide epitheliale Zelllinie aus menschlichem Gewebe, die in dauerhafte Kultur genommen wurde. Diese Zelllinie wurde im Jahre 1951 aus einem Zervixkarzinom einer 31

Jahre alten Farbigen gewonnen. Aufgrund seiner frühen Entstehung ist HeLa einer der am besten untersuchten Zelllinien überhaupt. Über ATCC ist Passage 90 zu beziehen.

[DMEM, 10 % (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotica/L-Glutamin-Lösung, MEM 100 x Vitaminlösung]

Hey

Diese Zelllinie wurde aus einem mäßig differenziertem Zystadenocarcinom des Ovars gewonnen (Buick et al., 1985). Sie ist als Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor positiv beschrieben worden. Die Zelllinie ist nicht über ATCC zu beziehen. Die verwendete Passage dieser Zelllinie ist unbekannt.

[RPMI, 10 % (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotica/L-Glutamin-Lösung, MEM 100 x Vitaminlösung]

NIH:Ovcar3

Die Ovcar3 Zelllinie wurde im Jahr 1982 von einer Patientin mit fortgeschrittenem Adenokarzinom isoliert (Hamilton et al., 1983). Die Zelllinie ist sowohl Androgenrezeptor als auch Östrogenrezeptor positiv.

[DMEM, 10 % (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotica/L-Glutamin-Lösung, MEM 100 x Vitaminlösung]

BT20

Diese Mammakarzinom-Zelllinie wurde im Jahre 1958 aus Zellen etabliert, die aus einem in Scheiben geschnittenem Mammakarzinom auswuchsen. Über ATCC ist eine späte Passage zu beziehen (p248).

[DMEM, 10 % (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotica/L-Glutamin-Lösung, MEM 100 x Vitaminlösung]

U2-OS

Diese Zelllinie wurde im Jahr 1965 aus einem mäßig differenziertem Sarkom des Schienbeins eines 15-jährigen Mädchens isoliert. Die Zelllinie ist hypertriploid und weist zahlreiche chromosomale Aberrationen wie Brüche und Ringe etc. auf. Die über ATCC zu beziehende Passagennummer ist unbekannt.

[DMEM, 10% (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotica/L-Glutamin-Lösung, MEM 100 x Vitaminlösung]

SK-BR3

Diese Zelllinie wurde 1970 von G. Tempe und L.J. Old aus einem Pleuraerguß isoliert. SK-BR-3-Zellen stammen von einem Mammakarzinom einer 43 Jahre alten Frau und sind hypertriploid bis hypertetraploid.

[DMEM, 10% (v/v) FCS, Antibiotika/Antimykotica/L-Glutamin-Lösung, MEM 100 x Vitaminlösung]

3.3.2 Kulturmedien und Zusätze

Es wurden die folgenden Nährmedien verwendet:

- McCoy 5A Medium (modifiziertes Medium nach McCoy, Gibco) mit oder ohne Phenolrot
- D-MEM Medium (Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium, Gibco) mit oder ohne Phenolrot
- RPMI Medium (Biochrom KG, Berlin)

Jeweils mit folgenden Zusätzen:

- 10 % FCS (Gibco)
- 200 mM L-Glutamin (Gibco)
- Antibiotika/Antimykotika-Lösung
- MEM-Vitamin-Lösung

-D-MEM-F12 Medium (Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium, Nutrient Mixture F12, Gibco) mit oder ohne Phenolrot

Mit folgenden Zusätzen:

- 10 % FCS (Gibco)
- 200 mM L-Glutamin (Gibco)
- Antibiotika/Antimykotika-Lösung 5 ml
- Hepes Buffer, 10 mM (Sigma-Aldrich)

-Antibiotika/Antimykotika Lösung (10000 IE Penicillin, 1000 g Streptomycin, 25 µg Amphotericin B in 0,85 % Kochsalzlösung)

-MEM-Vitamin-Lösung 100 x (NaCl, D-Ca Panthothenat, Cholinchlorid, Folsäure, i-Inositol, Nikotinamid, Pyridoxal HCL, Riboflavin und Thiamin)

-0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA (Gibco)

-PBS (Seromed)

-Sterilfilterflaschen (CorningTM, Sigma-Aldrich)

3.3.3 Behandlung von FCS mit Aktivkohle

500 ml FCS wurden mit 1,25 g Aktivkohle und 0,125 g Dextran 30 Minuten bei 57° C unter Schütteln inkubiert und anschließend bei 16000 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit 1,25 g Aktivkohle und 0,125 g Dextran versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand durch eine Sterilfilterflasche filtriert und bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung erfolgte bis zum konfluenten Wachstum in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in 50, 125 und 250 ml Gewebekulturflaschen (50 ml, Greiner GmbH, Solingen). Bei allen Zelllinien wurde das Medium mindestens zweimal pro Woche gewechselt. Für den Mediumwechsel wurde das alte Medium mit einer sterilen Einmalpipette entfernt und durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt. Vor Experimenten bei denen die Zellen mit Östrogen oder Antiöstrogenen stimuliert wurden, wurden die Zellen für mindestens 48 Stunden in östrogenfreiem Medium kultiviert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Medium ohne Phenolrot mit Aktivkohle-behandeltem Serum (3.3.3) weiterkultiviert.

In Stickstoff gelagerte Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und in 5 ml des jeweiligen Mediums in 50 ml Kulturflaschen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht.

3.3.5 Subkultivierung von Monolayerkulturen

Konfluente Kulturen – Kulturen bei denen der Boden der Gewebekulturflasche vollständig bewachsen war - wurden in neue Kulturflaschen überführt („passagiert“). Hierzu wurde das Medium entfernt, die adhären Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin /0,02 % EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten (maximal 5 Minuten). Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe einer gleichen Menge Zellkulturmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde dann in 15 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner) überführt und die Zellen bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert und durch mehrmaliges Aufziehen der Suspension durch eine Kanüle (0,8 x 40 mm, Becton Dickinson) vereinzelt. Die Bestimmung des Zelltiters erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (s.u.). Zum Anlegen einer neuen Kultur wurden entsprechend der verwendeten Gewebekulturflaschen die jeweilige Zellzahl ausgesät (zum Beispiel: 5x 10⁵ Zellen in 10 ml Medium in 250 ml Gewebekulturflaschen).

3.3.6 Bestimmung des Zelltiters

Nach Ernte der Zellen mußte für die Subkultivierung (s. o.) oder die Kryokonservierung der Zelltiter bestimmt werden. Dies erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 4 Großquadrate ausgezählt. Der Zelltiter berechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = n/16 \times 10^6 \quad (n = \text{gezählte Zellen})$$

3.3.7 Kryokonservierung

Die Zellen wurden wie unter 3.3.5 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Zum Einfrieren wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 5% Dimethyl-sulfoxid, DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt (Greiner, 2 ml), bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.4 DNA-Isolierung

3.4.1 Plasmid Minipräparation aus *E. coli*

Das Prinzip dieser DNA-Isolierung ist eine alkalische Denaturierung von Plasmid- und chromosomaler DNA. Dabei können sich die Einzelstränge der zirkulären, kovalent geschlossenen Plasmid-DNA nicht voneinander trennen und bilden einen Komplex. Durch Neutralisierung werden die Plasmide renaturiert. Bei der größeren chromosomalen DNA ist das nicht möglich, so daß diese zusammen mit den Proteinen abzentrifugiert werden kann.

Alkalischer Lysepuffer

NaOH 0,2 M

SDS 1 %

Kaliumacetat-Puffer

Kaliumacetat 2,55 M

pH 4,8; eingestellt mit konz. Essigsäure

TE-Puffer

TRIS/HCl 10 mM

EDTA 1mM

pH 8,0

TE(H)-Puffer

TRIS/HCl 50 mM

EDTA 20 mM

pH 8,0

Eine Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37°C in 6 ml LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefextrakt, 0,5 % NaCl) mit Ampicilin (100 $\mu\text{g/ml}$) angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen

abzentrifugiert (5 Minuten, 2500 x g, RT), in 150 µl TE(H)-Puffer aufgenommen und durch Zugabe von 150 µl Lysepuffer lysiert. Die Lösung wurde unter gelegentlichem Schwenken inkubiert, bis eine klare Lösung entstand. Zur Neutralisierung der Lösung und Renaturierung der Plasmid-DNA wurden 150 µl Kaliumacetat-Puffer zugesetzt. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden Proteine und Zelltrümmer abzentrifugiert (30 Minuten, 15000 x g, 4 °C). Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1). Dazu wurden die Lysate mit 1 Volumen PCI versetzt und für etwa 1 Minute kräftig geschüttelt. Durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die wässrige von der organischen Phase getrennt. Die wässrige DNA-haltige Oberphase wurde abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol geschüttelt und wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und für 1 Stunde bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (20 Minuten bei 12000 g) wurde das Pellet kurz in 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer oder Aqua dest aufgenommen.

3.4.2 Plasmid Midi- und Maxipräparation aus *E. coli*

Die Midi bzw. Maxipäparation von Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des Quiagen Plasmid Midi Kit bzw. dem Quiagen Plasmid Maxi Kit der Firma Quiagen (Hilden). Das Aufreinigungsprinzip beider Systeme ist gleich, es werden jedoch unterschiedliche Mengen an Lösungen und Säulen mit unterschiedlichen Bindekapazitäten für Plasmid-DNA eingesetzt. Laut Hersteller liegt die Ausbeute dieser Methode bei 100 µg DNA pro Midipräparation und 500 µg pro Maxipräparation. Das Trennprinzip ist identisch mit dem der Minipräparation. Die Aufreinigung der DNA erfolgt hierbei jedoch nicht über eine Phenolextraktion, sondern mit Hilfe einer Anionen-Austauscher-Säule.

Es wurde mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen gearbeitet.

Zellen aus einer frischen Vorkultur wurden in 25/100 ml Ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen geerntet (5000 x g, 10 Minuten) und in 4/10 ml Resuspensionslösung (Puffer P1) aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zusatz von 4/10 ml Lysislösung (P2) und 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach anschließender Neutralisation mit 4/10 ml eiskalter Neutralisationslösung (P3) wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA abzentrifugiert (15000 x g, 10 Minuten, RT). Der Überstand wurde auf die mit 4/10 ml Äquilibrierungslösung (Puffer QBT) eingestellte Säule gegeben. Nach zwei Waschschritten mit 10/30 ml Waschlösung (Puffer QC) wurde die Plasmid-DNA mit 5/15 ml Elutionslösung (Puffer QF) eluiert und einer Isopropanolfällung zugeführt (siehe 3.4.1). Die gefällte DNA wurde nach dem Trocknen (5 Minuten, 50 °C) in 100/500 µl TE-Puffer oder Aqua dest. aufgenommen.

3.4.3 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Direkt nach der Entnahme aus der -80°C Truhe wurde das Gewebe in grobe Stücke zerteilt. In einer Teflonkapsel mit Wolframkugel wurden die Stücke in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Danach wurden diese in einem Mikrodismembrator (Braun Biotech Int., Melsungen) für 1 Minute bei 2000 rpm zertrümmert. Das pulverisierte Gewebe wurde in 4 ml Verdaupuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 0,5 % SDS) aufgenommen und nach Zugabe von 0,1 mg/ml Proteinase K (Sigma) über Nacht bei 50°C unter Schütteln inkubiert.

Die Extraktion der DNA erfolgte mit PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1). Dazu wurden die Proben mit 1 Volumen PCI gemischt und zur Phasentrennung für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Die wässrige DNA-haltige Oberphase wurde in ein frisches Röhrchen überführt, mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gründlich geschüttelt und wie zuvor zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem absolutem Ethanol und 0,5 Volumen 7 M Ammoniumacetat. Nach mindestens 60 Minuten bei -20°C wurde die präzipitierte DNA durch Zentrifugation (15 Minuten bei 4000 rpm) sedimentiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde die DNA getrocknet und in Aqua dest gelöst.

3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit einem Lambda Bio UV/VIS Spektrometer von Perkin Elmer bei 260 und 280 nm ($1\text{E}_{260\text{nm}}$ entspricht $50\ \mu\text{g/ml}$ DNA). Die Reinheit der Proben kann durch Messung bei 280 nm ermittelt werden, da dort das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Bei einer sauberen Präparation sollte das Verhältnis von $\text{OD}_{260/280}$ bei 1,8 bis 2,0 liegen. Die Grundabsorption der Proben wurde bei 310 nm gemessen.

Die Berechnung der DNA-Konzentration von Proben mit entsprechender Reinheit erfolgte nach folgender Formel:

$$c(\text{mg/ml}) = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) \times 0,05 \times \text{VF}$$

c = DNA-Konzentration

VF = Verdünnungsfaktor

3.5 RNA-Isolierung

Die zur RNA-Isolierung eingesetzten Lösungen wurden, um RNAsen zu inaktivieren, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Dazu wurde DEPC im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt und anschließend im Verhältnis 1:100 den Lösungen zugesetzt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde das DEPC durch Autoklavierung zerstört. Spatel und Pinzetten wurden über Nacht bei 300°C im Wärmeschrank behandelt.

3.5.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

Der Gewebeaufschluß erfolgte wie in Punkt 3.4.3 beschrieben. Das pulverisierte Gewebe wurde sofort in 1 ml Trizol aufgenommen und homogenisiert. Um die Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu ermöglichen, wurden die Proben für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe etwa 15 sek von Hand geschüttelt und für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Oberphase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 12000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 9500 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei 55 °C für 5-10 Minuten im Thermoblock getrocknet und je nach Ausbeute in 20 bis 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch nach Lambert-Beer. Die mit dieser Methode gewonnenen RNA ist Gesamt-RNA.

3.5.2 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Die adhärennten Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und durch Zugabe von 1 ml Trizol (Gibco) lysiert.

Mit Östrogenen oder Antiöstrogenen behandelte Zelllinien wurden in 6-Loch Platten kultiviert. Um Verluste bei der RNA-Isolierung dabei möglichst gering zu halten, wurde die Ernte der Zellen folgendermaßen modifiziert: Das Medium wurde entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch direkte Zugabe von 1 ml Trizol pro Loch (1,6 cm²) lysiert. Durch mehrmaliges Aufziehen des Lysates wurde die Probe homogenisiert. Die Proben können in dieser Form für mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden oder direkt zur RNA-Isolierung eingesetzt werden. Die Aufreinigung der RNA erfolgte wie unter 3.5.1 beschrieben.

3.6 cDNA Synthese

Bei dieser Reaktion wird mit Hilfe einer viralen reversen-Transkriptase RNA in sogenannte cDNA transkribiert, die im Gegensatz zur chromosomalen DNA keine Introns mehr enthält. cDNAs von Genen können daher, anders als die chromosomale DNA, zur Expression in Prokaryoten verwendet werden. Um die gesamte RNA-Population zu erfassen, werden unspezifische Hexanucleotide (Random-Primer) eingesetzt. Dies ermöglicht parallel mehrere Transkripte zu untersuchen und die Genexpression zu quantifizieren.

5 µg RNA wurden zunächst 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. In der Zwischenzeit wurden die Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese angesetzt.

Reagenzien für die cDNA-Synthese (Angabe der Endkonzentrationen)

PCR-Puffer (Pharmacia)	(50 mM KCl, 10 mM Tris)
MgCl ₂	7,5 mM
BSA (RNase frei)	0,1 mg/ml
DTT	15 mM
Nukleotide	Je 1 mM
RNasin (Promega)	1 U/µl
Random Primer	1000 pmol
MuL _v -Reverse Transkriptase	9,5 U (Pharmacia)
ad 20 µl mit H ₂ O (DEPC-behandelt) pro Reaktion	

Zu der denaturierten RNA wurden 20 µl der Reaktionsansatzes pipettiert und der Reaktionsansatz in einem Thermo-Cycler (Hybaid, MWG Biotech) 10 Minuten bei 26 °C und 45 Minuten bei 42 °C inkubiert. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurden die Reaktionsansätze für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis wurden die cDNA Proben bei -20 °C gelagert.

3.6.1 Kontrolle der cDNA durch β-Actin PCR

Die synthetisierte cDNA wurde mittels einer β-Actin PCR auf Kontaminationen mit genomischer DNA und ihre Qualität untersucht. Die Primer (5'-AGAGATGGCCACGGCTGCTT-3'; 5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAG-3'; 35 Zyklen: 94°C 1 Minute, 62°C 1 Minute, 72°C 1 Minute) wurden so gewählt, daß die genomische DNA ein 652 bp großes Fragment ergibt und die cDNA ein 446 bp großes Fragment.

3.7 Auftrennung von Nukleinsäuren

3.7.1 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren haben aufgrund der negativen Ladungen des Phosphatrückrates die Eigenschaft im elektrischen Feld in Richtung der Anode zu wandern. Diese Eigenschaft kann man nutzen, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen, indem man sie in Agarosegelen auftrennt. Der Siebeffekt der Agarose hat zur Folge, daß kleine DNA-Fragmente im Gel schneller wandern als große. Die Laufweite der DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe des Moleküls. Durch Variation der Agarosekonzentration kann man die Trennschärfe von Agarosegelen variieren und somit DNA-Fragmente über einen weiten Größenbereich trennen.

<u>Agarose-Konzentration des Gels (%)</u>	<u>Trennbereich linearer DNA-Moleküle (kb)</u>
0,3	5,0-60
0,6	1,0-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-4
2,0	0,1-3

Tabelle 3.4: Optimale Agarosekonzentration zur effizienten Trennung von linearen DNA-Fragmenten

Erforderliche Lösungen:

1 x TBE-Puffer

TRIS	8,9 mM
Borsäure	8,9 mM
EDTA	0,2 mM
pH	8,0

Gelladepuffer

Harnstoff	7 M
Glycerin	40 % (v/v)
EDTA	50 mM
TRIS	10 mM
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
pH	8,0

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg / ml in Aqua dest.

Arbeitskonzentration 2 µg / ml

Agarose (Gibco BRL)

Die Agarose wurde in 1 x TBE suspendiert und durch Aufkochen gelöst. Um ein Agarosegel herzustellen, wurde die Agarose in eine Form mit einem Kamm gegossen, der zur Erzeugung der Probenaschen dient. Die Elektrophorese erfolgte in einer Horizontalapparatur in 1 x TBE. Die Proben wurden mit 1/5 Vol. Gelladepuffer versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in Abhängigkeit von der angelegten Spannung (20-120 V) für 1-16 Stunden. Zum Anfärben

der DNA wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) überführt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und kann durch UV-Licht (302 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden.

3.7.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Detektion von CY-5 markierten DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von DNA-Sequenzierautomaten (A.L.F. und A.L.F.-Express von Amersham Pharmacia). Bei diesem System wird die Fluoreszenz der markierten PCR-Fragmente im Polyacrylamid-Gels durch einen Laserstrahl im unteren Drittel der Gelapparatur angeregt. Die emittierte Strahlung wird von Photodioden bei einer Wellenlänge von 488 nm (A.L.F.) oder 632,8 nm (A.L.F.-Express) detektiert. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird direkt während der elektrophoretischen Auftrennung gemessen und die Daten werden durch eine gekoppelte EDV erfasst und gespeichert. Nach Beendigung des Laufes kann dieser mit Hilfe einer speziellen Software ausgewertet werden.

Sequenzgele bestehen aus Polyacrylamid und werden als dünner Film zwischen zwei Glasplatten gegossen. Da beim Gießen eines Sequenzgels schon geringste Verunreinigungen auf den Glasplatten zu Lufteinschlüssen im Gel führen können, wurden die Glasscheiben zunächst gründlich mit H₂O und technischem Ethanol gereinigt. Für die Gellösung wurden 25,2 g Harnstoff und 10 ml Acrylamide/bis-Acrylamide Lösung (19:1 für Sequenzierungen, 29:1 für Fragmentanalysen, Sigma) in 25,4 ml Aqua dest. gelöst und für 10 Minuten mit 5 g Amberlite gerührt. Parallel wurden 6 ml 6x TBE filtriert und entgast. Nach dem Rühren wurde die Gellösung ebenfalls filtriert, dem TBE zugesetzt und der gesamte Ansatz für weitere 5 Minuten entgast. Anschließend wurde die Polymerisation mit 200 µl Amoniumpersulfat (APS, 10 %, w/v, Sigma) und 10 % TEMED (Sigma) gestartet, die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel ausgehärtet war (ca. 2 h), wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die beiden Puffertanks der Vertikalapparatur mit TBE-Puffer gefüllt und der Kamm gezogen. Für die Sequenzanalyse wurde jeweils ein ganzer Reaktionsansatz (A, C, G oder T) pro Spur aufgetragen (ca. 13 µl). Bei Fragmentanalysen wurden jeweils 6 µl verdünnter PCR-Produkte (1:2 bis 1:50) mit A.L.F. Laufpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und für 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

Laufbedingungen :	Fragmentanalyse	Sequenzieranalyse
Spannung :	1500 Volt	1500 Volt
Strom	34 mA	34 mA
Leistung :	38 Watt	30 Watt
Temperatur	40 °C	50 °C
Laufpuffer	0,6 x TBE	0,6 x TBE

TBE-Puffer

TRIS	100 mM
Borsäure	90 mM
EDTA	16 mM

3.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). Bei dieser Methode erfolgt die Replikation eines DNA-Stranges bis zum Einbau eines 2'-3' Didesoxynukleotids in den neusynthetisierten Strang. Dies führt zum Kettenabbruch, da der DNA-Polymerase eine freie 3' OH-Gruppe fehlt. Dabei enthält jeder der vier Ansätze einer Sequenzierung neben den vier Desoxynukleotiden nur eine Variante der Didesoxynukleotide (ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP). Daher finden sich in jedem Reaktionsansatz spezifische DNA-Fragmente, die jeweils immer auf G, A, T oder C enden. Diese Fragmente werden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Aus deren Laufweite kann, bei unmittelbarem Vergleich der vier Spuren, auf die Sequenz der DNA geschlossen werden. Der Startpunkt der Sequenzierung kann dabei durch Wahl eines spezifischen Primers festgelegt werden.

Die zu sequenzierenden DNA-Fragmente werden zunächst durch eine PCR amplifiziert (3.11). Daher ist bei dieser Methode eine Sequenzierung mit sehr geringen Mengen an Template-DNA möglich.

3.8.1 Sequenzier-Reaktion

Als Ausgangsmaterial wurden mit M13-getaggte Primern amplifizierten und mit Hilfe von MikroSpin-Säulen (MicroSpin S-300 für PCR Fragmente < 200 bp; MicroSpin S-400 für PCR-Fragmente > 200 bp) aufgereinigte PCR-Produkte verwendet. Für die Sequenzier-Reaktion wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“ der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Die Sequenzierung erfolgte in 4 PCR-Cups (0,2 ml) pro Probe (je ein Cup pro Base).

Es wurden CY5- (A.L.F.-Express) markierte Primer verwendet, da die Sequenzier-Reaktion mit Hilfe eines A.L.F.-Express Sequenzierers detektiert wurde. Um Verdampfungsverluste zu vermeiden, wurde auf jeden der 4 Ansätze ein Tropfen Mineralöl gegeben. Vor der Sequenzier-Reaktion wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

Ein Reaktionsansatz für die Sequenzier-Reaktion setzt sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz:

Template DNA (gereinigtes PCR-Produkt)	5 µl
fluoreszenzmarkierter Primer	1 µl (1pM/µl)

Reaktionsmix (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)	2 μ l
Gesamtvolumen	8 μ l

G, A, T bzw. C Reaktionsmix:

TRIS/HCl (pH9,5) MgCl₂, Tween 20, Nonidet P40, 7-deazaGTP, dATP, dTTP, ddXTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA-Polymerase.

(X steht hier für den jeweiligen Ansatz, also G, A, T oder C)

Stop Mix (Amersham Pharmacia)

Es wurden die folgenden Sequenzierbedingungen gewählt:

Sequenzierprimer	Bedingungen
reversal	55 °C 30 sec 95 °C 30 sec 30 Zyklen
universal und alle anderen	60 °C 30 sec 95 °C 30 sec 30 Zyklen

Nach Beendigung des Programms wurden die Ansätze mit 5 μ l Stoppmix versetzt und auf Eis gelagert. Vor dem Auftragen wurden die Proben nochmals für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

3.9 Klonierung

3.9.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden Restriktionsenzyme der Firma Roche verwendet. Es wurden die von dem Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Bei Mehrfachrestriktionen wurde der Puffer eingesetzt, bei dem laut Hersteller die größtmögliche Aktivität für alle Enzyme zu erwarten ist. Zur Restriktion wurde zunächst eine definierte Menge DNA in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und unter Berücksichtigung des Endvolumens (einschließlich Enzymmenge) mit 10 x Restriktionspuffer und Aqua dest. versetzt. Als letztes wurden die Restriktionsenzyme zugesetzt, wobei pro μ g DNA 1 Unit eingesetzt wurde. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte für 2 Stunden oder über Nacht bei 37°C. Zur Entfernung von RNA wurde gegebenenfalls Ribonuklease zugesetzt.

Ribonuclease A:

10 mg / ml in Aqua. dest. lösen, 10 Minuten bei 100°C kochen und langsam abkühlen lassen, Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C.

3.9.2 Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick-Gel-Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet.

Das Prinzip dieser Methode ist die Auflösung des Geles durch Natriumperchlorat und die Anbindung der DNA-Fragmente an eine Anionenaustauscher-Säule. Nachdem die Säule mehrfach gewaschen wurde, wird die DNA direkt in TE-Puffer eluiert.

Es wurden die vom Hersteller bereitgestellten Lösungen verwendet.

Nach der Gelelektrophorese wurde das zu isolierende DNA-Fragment mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein gewogenes Eppendorfgefäß überführt und das Gewicht des ausgeschnittenen Blöckchens ermittelt. Für je 100 mg Agar wurden 300 µl Puffer QX1 zugesetzt. Die Auflösung der Agarose erfolgte durch Inkubation in einem 50 °C-Heizblock für 10 Minuten, wobei der Ansatz alle drei Minuten durchmischt wurde. Anschließend wurde 1 Gel-Volumen Isopropanol zugesetzt, gemischt und der gesamte Ansatz durch eine QIAquick Säule zentrifugiert (1 Minute 10000 x g). Anschließend wurde die Säule einmal mit QX1-Puffer und einmal mit PE-Puffer gewaschen wobei wie zuvor zentrifugiert wurde. Zur Elution der DNA wurde die Säule für 1 Minute mit 50 µl TE-Puffer inkubiert und die DNA mit dem TE-Puffer abzentrifugiert (2 Minuten 13000 x g).

3.9.3 DNA-Ligation

Die T4-Ligase ist ein Enzym des Phagen T4. Es ist dazu in der Lage, überstehende kompatible und auch glatte Enden von DNA-Fragmenten miteinander zu verbinden.

Eingesetzte Lösungen:

10 x T4 -Ligationspuffer:

TRIS/HCl	660 mM
MgCl ₂	50 mM
DTT	10 mM
ATP	10 mM
	pH 7,5

Ein Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg DNA (Vektor und Insert in Verhältnis von 1:4)

1 µl 10 x T4-Ligationspuffer

1 U T4-Ligase

Aqua dest. ad 10 µl

Vor Zugabe des Ligationspuffers und der T4-Ligase wurde der Ansatz für 3 Minuten bei 68 °C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Dadurch wurden unerwünschte Konkatemere aufgelöst. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

3.9.4 Transformation von *E. coli* mit der CaCl₂ Methode

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von gelöster freier DNA durch Mikroorganismen.

I) Herstellung kompetenter Zellen

Da Mikroorganismen in der Regel keine natürliche Kompetenz zur Transformation besitzen, müssen die meisten Organismen durch Vorbehandlung kompetent gemacht werden.

Bei *E. coli* wird Kompetenz durch eine Vorbehandlung mit CaCl₂ erreicht (Mandel und Higa, 1970).

Eingesetzte Lösungen:

Lsg. I	100 mM CaCl ₂ (pH 7,0)
Lsg. II	LB-Medium mit 2 % Glucose und 10 µg / ml Thiamin

Zur Transformation wurden der *E. coli* Stamm XL1-Blue verwendet. Dazu wurden aus einer 7 ml Übernachtkultur 50 ml LB-Medium 2 % -ig angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 kultiviert. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 x g, 5 Minuten, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Lösung I aufgenommen, für 30 Minuten auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert (s. o.) und in 2 ml Lösung I resuspendiert. Die kompetenten Zellen können in diesem Zustand bis zu 48 Stunden bei 4 °C gelagert werden, oder unter Zusatz von 15 % Glycerin für mehrere Monate eingefroren werden.

II) Transformation

Ein Transformationsansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

Negativkontrolle	200 µl Zellen	50 µl Lsg. I	20 µl TE-Puffer
Positivkontrolle	200 µl Zellen	50 µl Lsg. I	1 µg Vektor DNA (pUCBM20)
Ligationsansatz	200 µl Zellen	50 µl Lsg. I	1-2 µg DNA

Die Ansätze wurden zunächst für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein kurzer Hitzeschock (42 °C, 3 Minuten). Die Regeneration der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Lsg. II und Inkubation für 90 Minuten bei 37 °C unter langsamen Schütteln. Anschließend wurde der gesamte

Ligationsansatz in 200 µl Aliquots auf Selektivnährböden ausplattiert. Von Positiv- und Negativkontrolle wurden jeweils nur einmal 200 µl auf Selektivnährböden ausplattiert.

3.9.5 Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation ist deutlich effizienter als die Transformation mit CaCl₂, bei dieser Methode können standardmäßig Transfektionsraten von 5×10^9 transfizierten Zellen pro µg pUC18 DNA erreicht werden (Vergleich CaCl₂ = 5×10^7 Zellen). Diese Methode ist daher bei Transformation mit niedriger Vektorkonzentration, wie z.B. nach „blunt end“ Ligationen, vorzuziehen.

I) Herstellung von kompetenten Zellen

1 L LB-Medium wurden mit 10 ml *E. coli* XL1-Blue aus einer frischen Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis gestellt und für 15 Minuten bei 4 °C und 4000 x g abzentrifugiert. Zur Entfernung des restlichen Mediums wurden die Zellen zweimal mit ½ Liter eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen, wobei jedesmal wie zuvor zentrifugiert wurde. Nach dem zweiten Waschschritt wurden die Zellen in 2-3 ml eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen (Zelltiter ca. 2×10^{10} Zellen/ml). In diesem Zustand können die kompetenten Zellen direkt verwendet werden oder in 40 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren werden. Eingefrorene kompetente Zellen bleiben für mindestens 1 Jahr verwendbar.

II) Transformation

Eingefrorene kompetenten Zellen wurden kurz bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf Eis gestellt, frische kompetente Zellen wurden direkt verwendet.

In einem eisgekühlten 1,5 ml Eppendorf Tube wurden 40 µl der kompetenten Zellen mit 1 µl DNA (in H₂O oder TE) gemischt und in eine eisgekühlte Elektroporations-Küvette (0,2 cm, Biorad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV (200 Ω, 25 µF) im Gene-Pulser der Firma Biorad. Nach der Elektroporation wurde die Küvette so schnell wie möglich mit 1 ml SOC-Medium aufgefüllt um eine Lyse der Zellen zu verhindern. Zur Regeneration wurden die Zellen in ein Kulturröhrchen überführt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde vom Ligationsansatz ein 200 µl und ein 20 µl Aliquot auf Selektivnährböden ausplattiert. Von Positiv- und Negativkontrolle wurden jeweils nur einmal 200 µl auf Selektivnährböden ausplattiert.

SOC-Medium

Trypton	2 %
Hefe-Extrakt	0,5 %

NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

3.10 DNA-DNA Hybridisierung

3.10.1 Koloniefilterhybridisierung

Zur Überprüfung einer kleinen Anzahl von *E. coli*-Transformanten werden Minipräparationen mit anschließender Restriktionsanalyse durchgeführt. Häufig ist es jedoch erforderlich, eine große Anzahl von Klonen zu überprüfen. Zu diesem Zweck wird eine Koloniefilterhybridisierung durchgeführt, bei der mehrere hundert Klone überprüft werden können. Dazu wurden die auf einer Agarplatte angezogenen Transformanten auf eine Nylonmembran übertragen, indem die Membran für 10 Minuten auf den Agar aufgelegt wurde. Dabei bleiben die Zellen an dem Filter haften und können durch 10 minütiges Auflegen des Filters auf mit 10% SDS getränktem Papier lysiert werden. Anschließend wurden die Zellen auf gleiche Weise für jeweils 10 Minuten mit Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer behandelt. Die einzelsträngige DNA wurde dann durch eine 30 minütige Hitzebehandlung bei 90°C an der Membran fixiert, wobei der Filter gleichzeitig getrocknet wurde.

3.10.2 Southern-Transfer

Beim Southern-Transfer wird die DNA von einem Agarosegel auf einen Filter übertragen. Dazu wurde das angefärbte Agarosegel zunächst photographiert, um eine spätere Zuordnung der Signale aus dem immunologischen Nachweis zu definierten Banden des Gels zu ermöglichen. Um den Transfer von großen DNA-Fragmenten (>10 kb) zu erleichtern, erfolgte eine Depurinierung durch Inkubation in 0,25 M HCl für 5 Minuten. Danach wurde das Gel für jeweils 30 Minuten mit Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer behandelt.

Als Blott-Gefäß diente eine Wanne, die etwa 10 cm hoch mit Zellstoff ausgelegt worden war. Darüber wurden drei Blatt 3 MM-Papier (Whatman) gelegt, auf die das Gel aufgelegt wurde. Um seitliche Kapillarströme zu vermeiden, wurden die Ränder des Gels mit Haushaltsfolie abgedeckt. Anschließend wurde der Nylonfilter luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt und die Lage der Probenaschen auf dem Filter markiert. Hierauf wurden 3 weitere Lagen 3-MM-Papier und eine 20 cm hohe Zellstoffschicht aufgelegt. Die Apparatur wurde mit einer Glasscheibe abgedeckt und einem Gewicht von 1-2 kg beschwert. Anschließend wurde die Blottwanne mit 20xSSC-Puffer gefüllt, so daß die DNA mit Hilfe des Pufferstroms vom Gel auf den Filter übertragen wurde. Der Transfer erfolgte für 12-24 Stunden. Anschließend wurde die DNA durch 5 minütige UV-Bestrahlung auf dem

Filter fixiert. Dieser wurde dann direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder im getrockneten Zustand bei 4°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

0,25 N HCl

Denaturierungspuffer

1,5 M NaCl
0,5 M Na OH

Neutralisierungspuffer

3 M NaCl
0,5 M TRIS/HCl
pH 7,5

20x SSC

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,0

3.10.3 Markierung von DNA

Die Markierung von DNA-Sonden wurde mit Hilfe des DIG-DNA-Markierungs- und Detektionskits der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, BRD) durchgeführt. Die Synthese der markierten DNA erfolgte dabei mit Hilfe des Klenow-Enzyms, einem Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, welches keine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt. Dabei diente ein Gemisch von Hexanukleotiden als Primer, die mit statistischer Verteilung an DNA binden. Der Polymerase wird für die Markierungsreaktion, neben den vier Desoxynukleotiden, DIG-gekoppelt dUTP angeboten (Digoxigenin ist ein Sekundärmetabolit des Fingerhutes, *Digitalis purpurea*). Dieses kann bei der Synthese des neuen Stranges anstelle von dUTP eingebaut werden, wodurch der neusynthetisierte Strang markiert wird.

Die zu markierende DNA (50-300 ng) wurde in einem Volumen von 15 µl Aqua dest. aufgenommen, für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis/NaCl abgekühlt. Anschließend wurde dem Ansatz je 2 µl Hexanukleotidmix und dNTP-Markierungsgemisch (1 mM dATP, 1mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP) sowie 1 µl Klenow-Enzym (2 Units) zugesetzt. Die Markierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.10.4 Hybridisierung von DNA

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Hybridisierungslösung

SSC-Puffer	5 x
Blocking-Reagenz	1 %
N-Laurylsarcosin	0,1 %
SDS	0,02 %
bei 50°C lösen, Lösung bleibt trüb	

2x Waschlösung

SSC	2 x
SDS	0,1 %

0,1x Waschlösung

SSC	0,1 x
SDS	0, %

Der Filter wurde mit 20 ml Hybridisierungslösung für 1h bei 68°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Das in der Hybridisierungslösung enthaltene Blocking-Reagenz bewirkt eine Ausschaltung von unspezifischen Bindungskapazitäten des Nylonfilters. Die denaturierte Sonde wurde in 20 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und der Filter darin über Nacht bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Sonde abgegossen und für weitere Verwendungen bei -20°C gelagert. Der Filter wurde zweimal für 5 Minuten mit 2x Waschpuffer bei Raumtemperatur und zweimal für 15 Minuten bei 68°C mit 0,1x Waschpuffer gewaschen.

3.10.5 Immunologischer Nachweis

Der Nachweis der Digoxigenin markierten DNA erfolgte mit Hilfe von Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, BRD) die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind.

Erforderliche Lösungen:

Puffer 1:

Maleinsäure	100 mM
NaCl	100 mM
pH	7,5

Puffer 2:

1% Blocking-Reagenz in Puffer 1

Waschpuffer:

Puffer 1 + 0,3% Tween 20

Puffer 3:

TRIS/HCl	100mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM
	pH 9,5

CSPD: 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5' -chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4yl)Phenylphosphate, Dinatriumsalz

Der Filter wurde für eine Minute bei RT in Puffer 1 gewaschen und danach für 30 Minuten in Puffer 2 inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in verdünnter Antikörperlösung (1:10000 in Puffer 2) inkubiert. Die Entfernung der ungebundenen Antikörper erfolgte durch zwei 15 minütige Waschschrte mit Waschpuffer. Nach Äquilibration der Membran für 1 Minute in Puffer 3 erfolgte die Inkubation mit dem Chemilumineszenz-Substrat. Dazu wurde die Membran in eine Folie gelegt und für 5 Minuten mit 300 µl verdünntem CSPD inkubiert. Durch kurzes Auflegen des Filters auf saugfähigem Papier wurde überschüssige Lösung entfernt. Anschließend wurde der Filter in eine neue Folie eingeschweißt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Exposition des Filters auf einem Röntgenfilm erfolgte in Abhängigkeit von der Stärke der Signale für 10 bis 240 Minuten, wobei Mehrfachexpositionen innerhalb von 24 h möglich waren.

3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine schnelle und einfache Methode zur *in vitro* Amplifikation von DNA. Voraussetzung für diese Methode ist die Anlagerung von zwei Primern (Oligonukleotide) an die komplementären Einzelstränge der zu amplifizierenden DNA. Die freien 3'OH-Enden der Primer können dann von einer DNA-Polymerase zur Synthese der komplementären Stränge verwendet werden. Dabei können Primer verwendet werden, durch die an den Flanken des PCR-Produktes neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme entstehen. Nach anschließender Denaturierung der neusynthetisierten DNA kann der Vorgang wiederholt werden. Die PCR ist somit eine zyklische Amplifikationsmethode. Sie setzt sich aus drei aufeinander folgenden Schritten zusammen.

- 1) Denaturierung des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen auf 95°C
- 2) Anlagerung der Primer an die Einzelstränge. Die Anlagerungstemperatur ist dabei abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der verwendeten Oligonukleotid-Primer und kann nach folgender Formel hinreichend genau ermittelt werden:

$$\text{Temp. [}^\circ\text{C]} = (\text{GCb} \times 4^\circ\text{C} + \text{ATb} \times 2^\circ\text{C}) - 5^\circ\text{C}$$

- 3) Synthese des komplementären Stranges durch die Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus* oder durch die Pwo-Polymerase von *Pyrococcus woesei* (Beide von Boehringer Mannheim, BRD). Diese bleiben auch bei Erhitzung auf 95 °C intakt und müssen daher nicht für jeden Zyklus neu zugesetzt werden. Das Temperaturoptimum der Reaktion liegt bei 72°C.

Durch eine mehrfache Wiederholung dieser 3 Schritte kommt es zur Amplifikation des von den Primern flankierten DNA-Fragmentes. Nach etwa 30 Zyklen nimmt die Amplifikation der DNA deutlich ab, da Primer und Nukleotide verbraucht sind und die Polymerase teilweise inaktiviert ist. Außerdem steigt mit der Anzahl der Zyklen die Wahrscheinlichkeit für eine Fehlamplifikation. Daher wurden die Amplifikationen mit maximal 34 Zyklen durchgeführt. Die PCR wurde, falls nicht anders angegeben, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Ansatz	Amplifikation
1 x PCR-Puffer	1 x 10 Minuten.
150 µm dNTPs	34 Zyklen 1 Minute 94°C
40 pmol Primer	1 Minute 58°C
2,5 U Taq-DNA-Polymerase	1 Minute 72°C
Reaktionsvolumen: 50 µl	1 x 8 Minute 72°C

Nach der PCR wurde die wässrige Phase mit einer Pipette vom Mineralöl getrennt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mit Hilfe des Quiaquick-PCR-Produkt-Purification-Kits der Firma Qiagen. Dabei wurde mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen gearbeitet und die vom Hersteller angegebenen Inkubationszeiten eingehalten. Das Prinzip dieses Verfahrens ist identisch mit dem des Quiaquick-Gel-Extraction-Kits, welches zur Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen eingesetzt wurde (3.9.2).

3.11.1 Quantitative RT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde die Expression von ER α , ER β und ER β 2 bestimmt. Bei dieser Methode wird ein Referenzgen koamplifiziert, welches konstitutiv hoch exprimiert wird. Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt. Die Bedingungen müssen so gewählt werden, daß die Menge an

gebildetem PCR-Produkt unabhängig von den eingesetzten Mengen Primern, Nukleotiden und Taq-Polymerase ist und die Reaktion im logarithmischen Bereich abläuft. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers und der Fragment Manager Software (Pharmacia)(3.7.2).

PCR-Produkte	PCR-Ansatz	Amplifikation
Östrogenrezeptor α : 438 bp GAPDH: 195 bp (27 Zyklen)	1 x PCR-Puffer 150 μ m dNTPs je 30 pmol ERA α -Primer 30 pmol GAPDH-Primer 2,5 U Taq-DNA-Polymerase Reaktionsvolumen: 50 μ l	1 x 10 Minuten. 32/27x 45 sec 94°C 1 Minute 58°C 1 Minute 72°C 1 x 8 Minute 72°C
ER β : 171 bp ER β 2: 225 bp GAPDH: 195 bp (27 Zyklen)	1 x PCR-Puffer 150 μ m dNTPs 40 pmol ER β -Primer 30 pmol GAPDH-Primer 2,5 U Taq-DNA-Polymerase Reaktionsvolumen: 50 μ l	1 x 10 Minuten. 32/27x 1 Minute 94°C 1 Minute 58°C 1 Minute 72°C 1 x 8 Minute 72°C

3.12 Reportergeren Assays

Zum Studium der Regulation von Promotoren wurden Reportergeren Assays durchgeführt. Dazu wurden die untersuchten Promotoren in ein Reporterplasmid kloniert, welches die Expression einer Luciferase unter Kontrolle dieser Promotoren ermöglicht. In Zellen die mit diesem Reporter Plasmid transfiziert worden sind, ist die Luciferase-Aktivität daher ein Maß für die Aktivität des klonierten Promotors. Die Luciferase-Aktivität kann mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion aus dem Lysat der transfizierten Zellen bestimmt werden. Um die Regulation von Promotoren zu untersuchen, können Expressionsplasmide für verschiedene Transkriptionsfaktoren mit dem Reporterplasmid kotransfiziert werden. Bei induzierbaren Transkriptionsfaktoren, wie z.B. dem Östrogenrezeptoren, kann zudem zwischen dem induzierten und dem nicht induzierten Zustand unterschieden werden, indem die kotransfizierten Zellen mit oder ohne Induktor (z.B. Östrogen) kultiviert werden.

Die Transfektion der Zelllinien erfolgte mittels Lipofektion oder Elektroporation. In jedem Falle wurden die Zellen 48 Stunden vor der Transfektion in phenolrot-freiem Medium kultiviert, da Phenolrot ein Nebenprodukt mit östrogenartiger Wirkung enthält. Außerdem wurde dieses Medium mit Aktivkohle behandeltem Medium supplementiert, um keine Steroidhormone aus dem Serum in das Medium einzutragen (3.3.3).

Um Schwankungen bei der Effektivität der Transfektion auszugleichen, wurde ein Plasmid welches eine β -Galactosidase exprimiert kotransfiziert. Die Aktivität der β -Galactosidase wird über einen β -Galactosidase-Test bestimmt (siehe unten) und kann als interner Standard verwendet werden, gegen den die Luciferase-Aktivität normalisiert wird. Bei jedem Experiment wurden die einzelnen Ansätze in dreifacher Ausführung durchgeführt. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

Verwendete Materialien:

1 x PBS (ohne Ca^{2+} und Magnesium $^{2+}$)

FugeneTM Liopofektions-Agenz (Roche)

LipofektaminTM (Gibco)

Elektroporations-Küvetten (Biorad, 0,4 cm)

1 x Lysispuffer: 5 x Lysispuffer (Promega) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ pH 7,0 mischen (1:5; v/v); Lagerung bei Raumtemperatur (vor jedem Gebrauch DTT (Endkonz; 1 mM) hinzufügen).

12-Loch und 6-Loch Gewebekultur-Platten (Nunc)

Optimem I-Medium (Gibco)

3.12.1 Transfektion humaner Zelllinien mit FugeneTM

Die Transfektion von humanen Zelllinien wurde, insofern dies mit ausreichender Effizienz möglich war, mit FugeneTM (Roche) durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung von FugeneTM ist nicht bekannt, es handelt sich aber nach Angabe des Herstellers um ein nicht liposomales (aber lipidhaltiges !) Transfektionsagenz. Mit FugeneTM lassen sich viele Zelllinien effizient transfizieren. Angaben über die Mengenverhält der transfizierten Plasmide sind dem Ergebnissteil zu entnehmen.

Aussähen der Zellen

Nach 48 Stunden Kultivierung auf Östrogen-freiem Medium werden die Zellen trypsinisiert und so in 12-Loch Platten ausgesät, daß sie am folgenden Tag ca. 60 % konfluent waren (ca. 1×10^5 /Loch).

Nach 24 h wird der Zustand der Zellen mikroskopisch überprüft und das Medium vor der Transfektion erneuert (800 μl /well, ohne Phenolrot mit SFCS).

Transfektion der Zellen

100 μl OptimemTM-Medium (Gibco) pro Well wurden in ein großes Falcon-Tube vorgelegt. Anschließend wurden pro Well 1,5 μl Fugene zugesetzt, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Lösung A) (Fugene-6TM Reagenz muß direkt zum Medium gegeben werden, um eine Absorption am Röhrchen zu verhindern).

Die DNA (0,5 µg/Loch/12-Loch-Platte) wurde in ein separates kleines Falcon-Tube vorgelegt, tropfenweise Lösung A zugesetzt, vorsichtig gemischt und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von dem DNA/Fugene6-Gemisch wurden anschließend tropfenweise 100 µl/Loch zu den Zellen mit Phenolrot-freiem Kulturmedium gegeben. Anschließend wurden die Platten geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Transfektionsagens zu erzielen.

Nach 24 Stunden wurde in Ethanol gelöstes und mit Kulturmedium verdünntes Östrogen (bzw. TAM, RLX) in einer Endkonzentration von 10^{-7} mol zugesetzt (100 µl). Dabei wurde darauf geachtet, daß die finale Ethanolkonzentration 0,1 % nicht übersteigt.

Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen 2 x mit PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) gewaschen, und anschließend mit 60 µl/well 1 x Lysispuffer mit 1 mM DTT (Promega) lysiert. Anschließend werden die Zellen mit einem Zellschaber (Nunc) abgekratzt. Die Lysate können zur späteren Verwendung bei -80 °C eingefroren werden.

3.12.2 Transfektion mit LipofektaminTM

Obwohl sich die meisten Zellen sehr gut mit FugeneTM transfizieren lassen, lassen sich andere Zelllinien besser mit LipofektamineTM transfizieren. Im Rahmen der Experimente die in dieser Arbeit vorgestellt werden, wurde LipofektamineTM nur zur Transfektion von Ishikawa-Zellen verwendet.

Die Zellen wurden zunächst in 12-Well Platten ausgesät (5×10^4 /well) und dabei gleichzeitig auf Phenolrot-freies Medium (mit Aktiv-Kohle-behandeltem FCS) gesetzt (1 ml/well), so das die Zellen am kommenden Tag etwa 60 % konfluent waren.

Transfektion

Die Plasmid DNA (0,5 µg insgesamt/well) wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 100 µl serumfreien Optimem I Medium gemischt (**Lösung A**).

Für jede Transfektion wird 1µl Lipofektamin mit 100 µl Optimem I gemischt (**Lösung B**).

Anschließend wurden **Lösung A** und **Lösung B** gemischt und zur Komplexbildung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Komplexbildung werden die Zellen 1x mit serumfreiem Optimem I (Gibco) gewaschen. Danach wurden 300 µl Optimem I zu den vereinigten Lösungen A und B gegeben, das Medium von den Zellen abgenommen, durch die Mixtur ersetzt und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 6 Stunden wurde 400 µl phenolrotfeies Medium mit Aktivkohle-behandeltem Serum zugesetzt. 18 Stunden später wurde das Medium von den Zellen abgenommen, durch frisches Medium mit Östrogen, Tamoxifen oder Raloxifen (jeweils 10^{-7} M) ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Die Lyse der Zellen erfolgte analog zur Lyse nach der FugeneTM Transfektion.

3.12.3 Transfektion durch Elektroporation

Die Elektroporation erlaubt die Transfektion einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelllinien. Die Bedingungen für die Elektroporation, insbesondere die Spannung, müssen dabei jedoch für jede Zelllinie optimiert werden. Die Transfektion mittels Fugene™ oder Lipofektamine™ ist jedoch deutlich einfacher in der Durchführung, zudem wird für die Elektroporation der meisten Zelllinien eine deutlich größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt. Die Lipofektion ist daher der Elektroporation im allgemeinen vorzuziehen.

Die humane Osteosarkom-Zelllinie U2-OS, lässt sich jedoch weder mit Fugene™ noch mit Lipofektamin™ effektiv transfizieren. Diese Zelllinie wurde daher mittels Elektroporation transfiziert.

Vor der Transfektion wurden die Zellen für mindestens 48 h auf Phenolrot-freiem Medium (mit Aktivkohle behandeltem Serum) inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert (3.3.5) und in kaltem Optimum I Medium mit 10 % Kohle-behandeltem FCS resuspendiert, der Zelltiter bestimmt und die Zellen auf Eis gestellt.

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden die zu transfizierenden Plasmide vorgelegt und mit Zellen (2×10^6 für zwei 6-Loch Platten) gemischt und das Volumen des Ansatzes auf 200 µl aufgefüllt. Dann wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Küvette (0,4 cm, Biorad) überführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar vor der Elektroporation wurden die Küvetten für 30 sec in einem 37 °C Wasserbad inkubiert, abgetrocknet und in den Elektroporator (Gene-Pulser, Biorad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 0,35 kV und 500 µF (Pulsdauer ca. 18 ms). Nach der Elektroporation wurden die Küvetten mit den Zellen für weiter 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Kulturmedium aus der Küvette gespült, auf zwei 6-Loch Platten verteilt und im Brutschrank kultiviert. Nach 6 h wurde das Kulturmedium gegen Kulturmedium mit 1 % FKS ausgetauscht. Am nächsten Tag wurden den transfizierten Zellen der Ligand (Östrogen, Tamoxifen oder Raloxifen) zugesetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, mit 100 µl Lysispuffer (Promega, mit 1mM DTT) lysiert und mit Zellschabern (Nunc) abgekratzt. Die Lysate können bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

3.12.4 Messung der Luciferase-Aktivität

Die eingefrorenen Lysate wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, durch Vortexen homogenisiert und in Luminometer-Röhrchen (Saarstedt) überführt. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte in einem Berthold-Lumat b0570 Luminometer. Dazu wurde nach der automatischen Injektion von 100 µl Luciferase-Assay-Reagenz (Promega) und einer Inkubation von 5 sec die Luciferase-Aktivität über einen Zeitraum von 5 sec gemessen.

3.12.5 Messung der Galaktosidase-Aktivität

Die Bestimmung der Galaktosidase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Galaktolight-Assay-Reagenz des Herstellers Tropix. Vor Beginn der Messung müssen dazu alle Lösungen auf Raumtemperatur gebracht werden.

Je 10 µl des Lysates wurden in ein Luminometer-Röhrchen vorgelegt und mit 100 µl Galaktolight-Reaktion-Buffer durch kurzes Vortexen gemischt. Nach einer Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung im Berthold-Lumat b0570 Luminometer. Dazu wurden nach einer automatischen Injektion von 100 µl Light-Emission-AcceleratorII und einer Inkubation für 10 sec die Galaktosidase-Aktivität über einen Zeitraum von 5 sec gemessen.

Material

Galaktolight-Assay-Reagenz (Tropix): Galactolight™ Reaktionspuffer
Galacton™ Chemilumineszenz Substrat

Galacton™ Chemilumineszenz-Substrat (Tropix) mit Galactolight-Reaktionspuffer mischen (1:250 v/v); Lagerung bei 4°C.

Light-Emission-AcceleratorII (Tropix)

Unmittelbar vor Gebrauch wurde 30 %ige H₂O₂ Lösung (1µl pro ml AcceleratorII) zugesetzt.

Der 1 x Lysispuffer, das Lucifersase-Assay-Reagenz, das Galaktolight-Assay-Reagenz und der Light Emission-AcceleratorII wurden vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht.

Röhrchen (Saarstedt 75 x 12 mm, No. 55.476)

4 Ergebnisse

4.1 Genregulation über AP-1- und ERE-Elemente

4.1.1 Etablierung der Methodik

Um die Genregulation durch Östrogenrezeptoren in menschlichen Tumoren untersuchen zu können, sollte ein Reporter-gen-System aufgebaut werden. Die endogene Expression von ER α und ER β kann möglicherweise die Regulation der Reportergene beeinflussen. Daher wurden Zelllinien aus verschiedenen Geweben durch eine quantitative RT-PCR (qRT-PCR) auf Expression von ER α und ER β untersucht. Die PCR zur ER α -Amplifikation erfolgte wie zuvor beschrieben (Green et al., 1986) (3.11.1). Dabei wurden Primer verwendet, die an Exon 4 und Exon 6 binden. Mit diesen Primern kann neben dem ER α WT (438 bp) auch eine verkürzte Variante mit einer Deletion von Exon 5 nachgewiesen werden. Als interner Standard wurden der PCR-Reaktion GAPDH-Primer zugesetzt (PCR-Produkt: 195 bp). Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über einen A.L.F. DNA-Sequenzierautomaten. Die Abbildung 4.1.1.1. zeigt die qRT-PCR der Zelllinien, welche für Reporter-gen-Studien verwendet wurden.

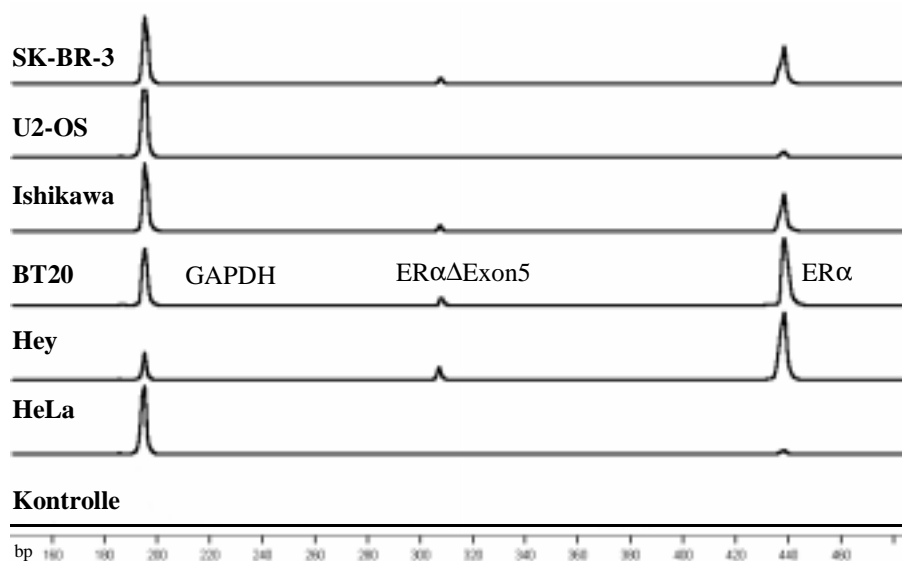


Abbildung 4.1.1.1: Expression von ER α in humanen Tumor-Zelllinien.

Elektrophoretogramm der qRT-PCR zum Nachweis der ER α -Expression in Zelllinien aus verschiedenen Geweben (SK-BR-3: Brust, U2-OS: Knochen, Ishikawa: Endometrium, BT20: Brust, Hey: Ovar, HeLa: Zervix; Kontrolle: PCR-Ansatz ohne cDNA)

Bei allen untersuchten Zelllinien konnte ER α nachgewiesen werden. Dabei scheint der Grad der Expression jedoch von Zelllinie zu Zelllinie stark zu schwanken. Bei unseren Experimenten war die ER α Expression in HeLa und U2-OS-Zellen am niedrigsten und in Hey-Zellen am höchsten

(Vergleiche GAPDH und ER α). Außerdem wurden die gleichen Zelllinien auf Expression von ER β untersucht. Dazu wurden zuvor beschriebene Primer (aus Exon 7 und 8) und PCR-Bedingungen (mit 32 Zyklen) verwendet (Leygue et al., 1999) (3.11.1). Bei keiner der untersuchten Zelllinien konnte ER β nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Obwohl alle Zelllinien ER α exprimieren, wird die Aktivität der Reporterplasmide in den meisten Zelllinien nicht durch Östrogen stimuliert, so lange kein ER-Expressionsplasmid kotransfiziert wird (siehe folgende Abschnitte). Lediglich in MCF7 Zellen kann der endogene ER die Reporter-gen-Aktivität stimulieren (nicht gezeigt) (Gläser, 2001). Diese Zelllinien wurden daher für unsere Experimente nicht verwendet.

Optimierung der Transfektion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mehrzahl der Zelllinien mit Hilfe des Lipofektionsagences FugeneTM (Roche) transfiziert (3.12.1). Eine effektive Transfektion der humanen Osteosarkom-Zelllinie U2-OS ist mit FugeneTM jedoch nicht möglich. Daher wurde diese Zelllinie durch Elektroporation transfiziert (3.12.3). Die Effizienz der Elektroporation hängt vor allem von der Spannung bei der Elektroporation ab. Bei U2-OS-Zellen wurde eine optimale Transfektion bei 350 bzw. 400 Volt erreicht (Abbildung 4.1.1.2).

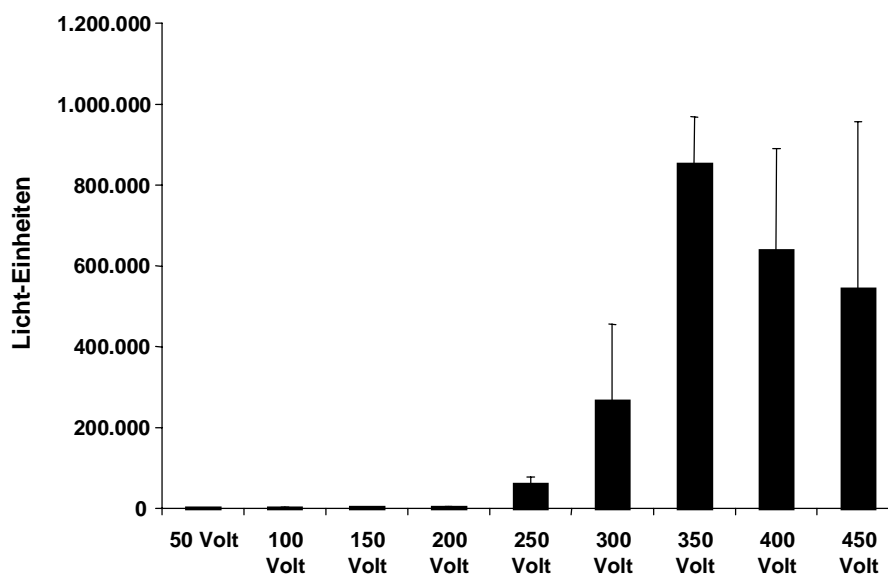


Abbildung 4.1.1.2.: Transfektionseffizienz bei der humanen Osteosarkom-Zelllinie U2-OS in Abhängigkeit von der Spannung.

Pro Küvette wurden 5 μ g BetaAct/Gal-Plasmid transfiziert. Die Transfektion wurde wie unter 3.12.3 beschrieben durchgeführt. Mit dem verwendeten Elektroporator können Spannungen von 50 bis maximal 450 Volt aufgebaut werden. Bei jeder Spannung wurden drei Küvetten transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Säulen zeigen die durchschnittliche β -Gal-Aktivität der drei Ansätze. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung zwischen den einzelnen Ansätzen.

Durch einen 30 Sekunden dauernden Hitzeschock (bei 37°C) unmittelbar vor der Transfektion wird die Effektivität der Transfektion mindestens um den Faktor 5 gesteigert (nicht gezeigt). Eine weitere Verbesserung der Methodik wurde erreicht, indem die Küvetten vor dem Hitzeschock auf Eis gelagert wurden (15-30 Minuten). Die Effektivität der Transfektion hängt außerdem in hohem Maße von der Vitalität der Zellen ab. Am effektivsten war die Transfektion, wenn die Zellen vor der Elektroporation zu etwa 70-80 % konfluent waren.

Die Effektivität der Lipofektion hängt vor allem vom Mengenverhältnis FugeneTM / Plasmid-DNA ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) ab. Laut Hersteller kann bei 3 μl Fugene pro μg Plasmid DNA eine effektive Transfektion von zahlreichen Zelllinien erreicht werden. Durch davon abweichende Mengenverhältnisse konnte keine effektivere Transfektion der Zelllinie SK-BR-3 erreicht werden (Abbildung 4.1.1.3).

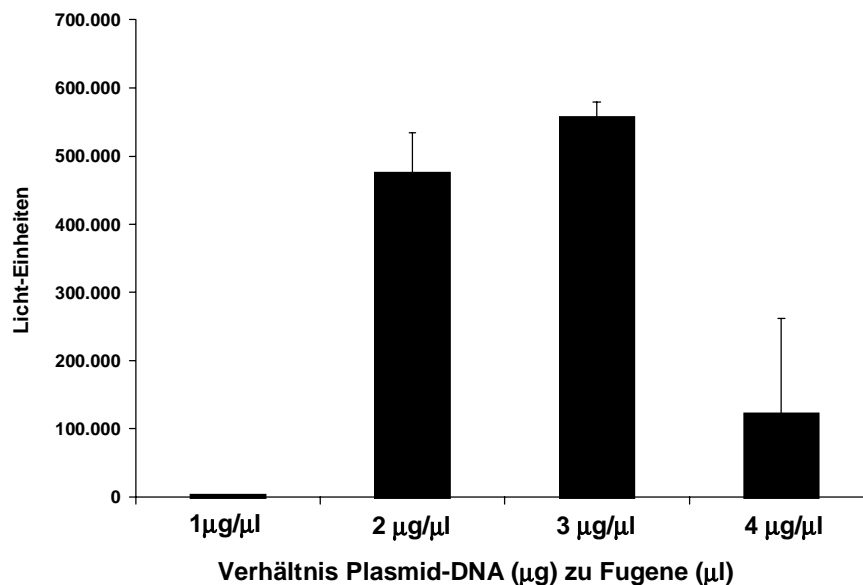


Abbildung 4.1.1.3: Optimierung der Transfektion mit FugeneTM.

SK-BR-3-Zellen wurden mit BetaAct/Gal-Plasmid transfiziert, wobei unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA eingesetzt wurden. Nach 24 Stunden wurde die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Säulen zeigen die durchschnittliche β -Gal-Aktivität der drei Ansätze. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung zwischen den einzelnen Ansätzen.

Stichproben haben gezeigt, daß ein Mengenverhältnis von 3/1 auch bei anderen Zelllinien optimal ist (nicht gezeigt). Mit Ausnahme der Zelllinie U2-OS konnten alle anderen Zelllinien unter diesen Bedingungen effizient transfiziert werden. Die Zelllinie U2-OS konnte auch bei anderen Mengenverhältnissen nicht effektiv mit FugeneTM transformiert werden (nicht gezeigt).

Regulation des β -Gal Plasmides

Schwankungen in der Effektivität der Transfektion können den Meßfehler eines Reporter-Gen-Assays vergrößern. Um diese Schwankungen auszugleichen, kann die Luciferase-Aktivität gegen einen internen Standard korrigiert werden. Zu diesem Zweck wird zumeist ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid mit dem Luciferase-Reporterplasmid kotransfiziert. Nach Messung der Luciferase- und β -Gal-Aktivität (3.12), kann dann die Luciferase-Aktivität gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert werden.

Für unsere Experimente können nur β -Galaktosidase-Expressionsplasmide verwendet werden, die keiner Regulation durch Östrogenrezeptoren unterliegen. Beim Expressionplasmid BetaAct/Gal steht die Expression der β -Galaktosidase unter Kontrolle des β -Actin Promotors (Abbildung 4.1.1.4). Der β -Act-Promotor vermittelt eine konstitutiv hohe Expression und unterliegt daher keiner Regulation durch Östrogenrezeptoren.

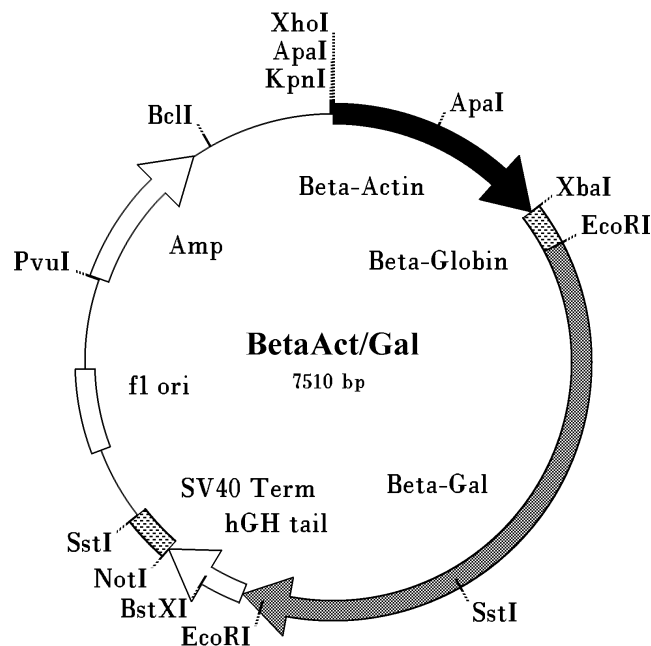


Abbildung 4.1.1.4: Das β -Actin Expressionsplasmid BetaAct/Gal.

Beta-Actin: Promotor des β -Actin Gens; Beta-Globin: β -Globin splice acceptor; Beta-Gal: β -Galaktosidase; SV40 Term: Terminator des SV40 Virus; Amp: Ampicilin-Resistenz (β -lactamase); fl ori: Plasmid-Replikationsursprung. Das Plasmid wurde von Miles Brown (Harvard Medical School, Boston) zur Verfügung gestellt.

Die Regulation des Plasmids BetaAct/Gal durch Östrogenrezeptoren wurde untersucht. Dabei konnte nur eine minimale Beeinflussung der β -Galaktosidase-Expression durch ER α gefunden werden. Der Promotor des Reporterplasmids ERE2-TK-Luc wird hingegen deutlich stärker reguliert. (Abbildung 4.1.1.5). Die Östrogenrezeptoren ER β und ER β 2 beeinflussen die β -Gal-Expression in geringerem

Umfang (nicht gezeigt). Ohne Östrogenrezeptoren konnte keine Regulation der beiden Promotoren gefunden werden (nicht gezeigt, siehe folgende Experimente).

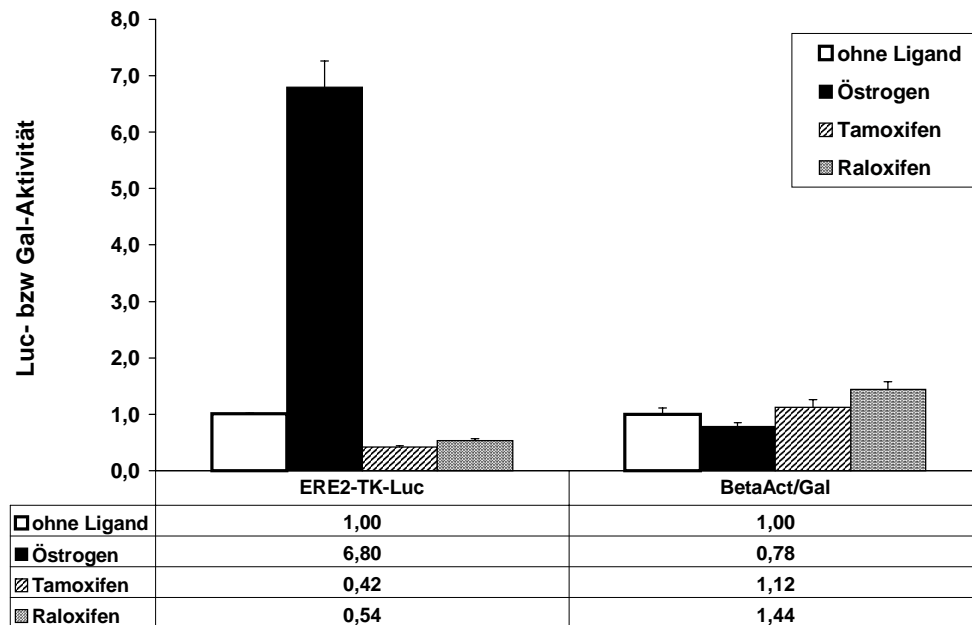


Abbildung 4.1.1.5: ER α Regulation von ERE2-Tk-Luc und BetaAct/Gal in SK-BR-3-Zellen.

SK-BR-3-Zellen wurden mit einem ER α -Expressionsplasmid und den Reporterplasmiden ERE2-TK-luc (300 ng/Loch) oder BetaAct/Gal (100 ng/Loch) kotransfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die nicht stimulierten Ansätze gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei separaten Messungen. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung zwischen den Messwerten.

Reproduzierbarkeit der Methodik

Die Reproduzierbarkeit der Methodik sollte überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde die Regulation des Reporterplasmides ERE2-Tk-Luc durch ER α in einem zeitlichen Abstand von mehreren Monaten wiederholt untersucht. Obwohl die Zellen zwischen den Experimenten permanent in Kultur waren, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten festgestellt werden. Lediglich die absolute Höhe der Stimulation bzw. der Repression ist bei den späteren Passagen etwas erhöht (Abbildung 4.1.1.6).

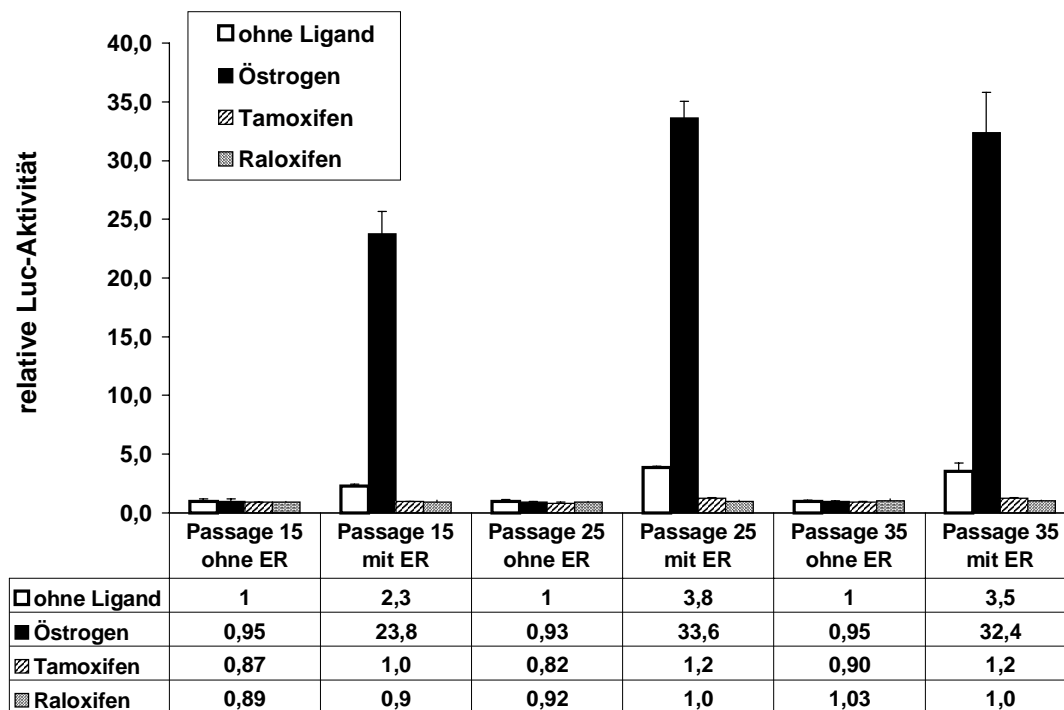


Abbildung 4.1.1.6: Reproduzierbarkeit der Methodik am Beispiel der Regulation von ERE2-TK-Luc durch ER α .

SK-BR-3-Zellen wurden transient mit ERE2-TK-Luc, BetaAct/Gal und pERAlpha transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurden gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. In der Abbildung sind drei verschiedene Experimente dargestellt, die in einem Zeitraum von ca. 3 Monaten durchgeführt wurden.

Allgemein konnte festgestellt werden, daß schnell wachsende Zellen besser stimulierbar sind als langsam wachsende Zellen. Da späte Passagen einer Zelllinie oft deutlich schneller wachsen als frühe Passagen, sind diese zumeist auch besser stimulierbar. Alle in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden innerhalb von 20 Passagen durchgeführt.

Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. In den zugehörigen Abbildungen sind die Mittelwerte der Experimente dargestellt.

4.1.2 Regulation von ERE2-TK-Luc in SK-BR-3-Zellen

Die Östrogen-abhängige Regulation eines Promotors über ERE-Elemente wurde untersucht. Dazu wurde ein Reporterplasmid verwendet, bei dem die Expression der Luciferase durch den Thymidin-Kinase-Promotor mit zwei zusätzlichen ERE-Elementen geregelt wird (Abbildung 4.1.2.1).

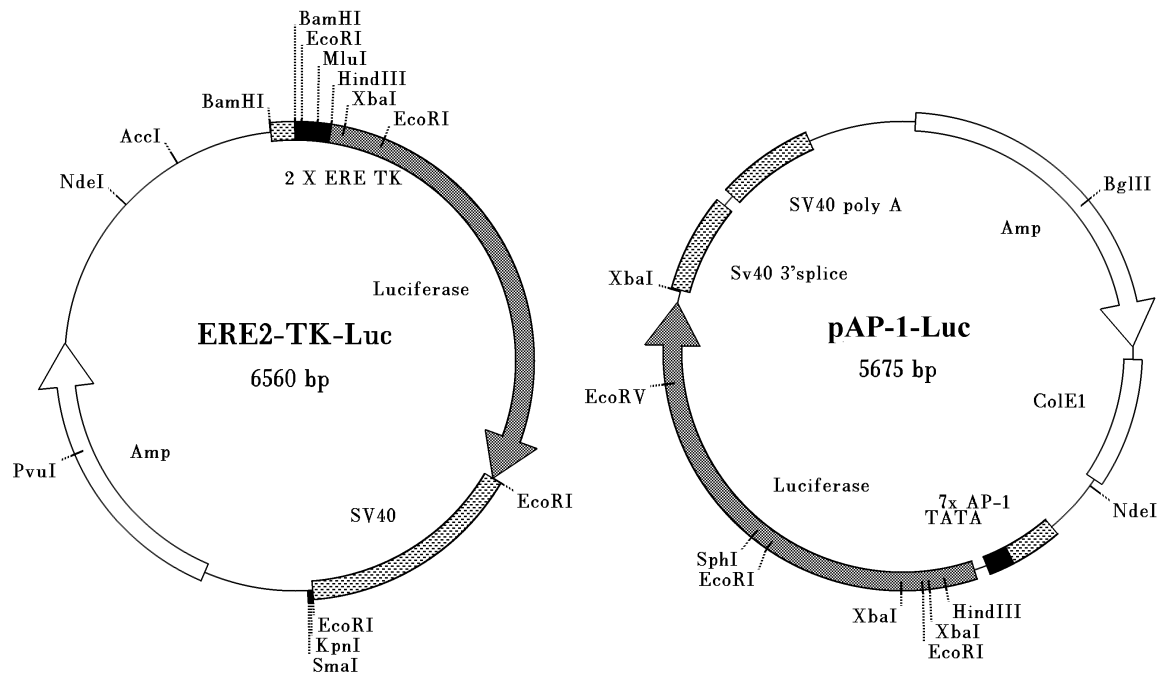


Abbildung 4.1.2.1: Die Reporterplasmide ERE2-TK-Luc und pAP-1-Luc.

Erläuterungen siehe Text. SV40: SV40 3'untranslated Region; Amp: β -lactamase; ColE1: ColE1 Plasmid-Replikationsursprung, fl ori, Plasmid-Replikationsursprung. ERE2-TK-Luc enthält zwei ERE-Elemente, pAP-1-Luc enthält 7 AP-1-Elemente.

Das Reporterplasmid (ERE2-TK-Luc) wurde von der Arbeitsgruppe von Miles Brown (Harvard Medical School, Boston) zur Verfügung gestellt. Da die Regulation dieses Reporters bereits in vielen Zelllinien gut untersucht ist, wurden die Experimente mit diesem Plasmid vor allem zur Verifizierung der Methodik durchgeführt. In Anlehnung an vorherige Veröffentlichungen wurden 100 ng ER-Expressionsplasmid (pcDNA, pERAlpha, pERBeta oder pERBeta2, Plasmidkarten im Anhang), 300 ng Reporterplasmid und 100 ng β -Gal-Plasmid pro Loch (einer 12-Loch Platte) transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Östrogen, Tamoxifen oder Raloxifen stimuliert (jeweils 10^{-7} M) und für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Luciferase- sowie β -Gal-Aktivität bestimmt (3.12).

Die Luciferase-Aktivität wurde gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert („relative Luc-Aktivität“). Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Die Abbildung 4.1.2.2 zeigt die Regulation von ERE2-TK-Luc in SK-BR-3-Zellen. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

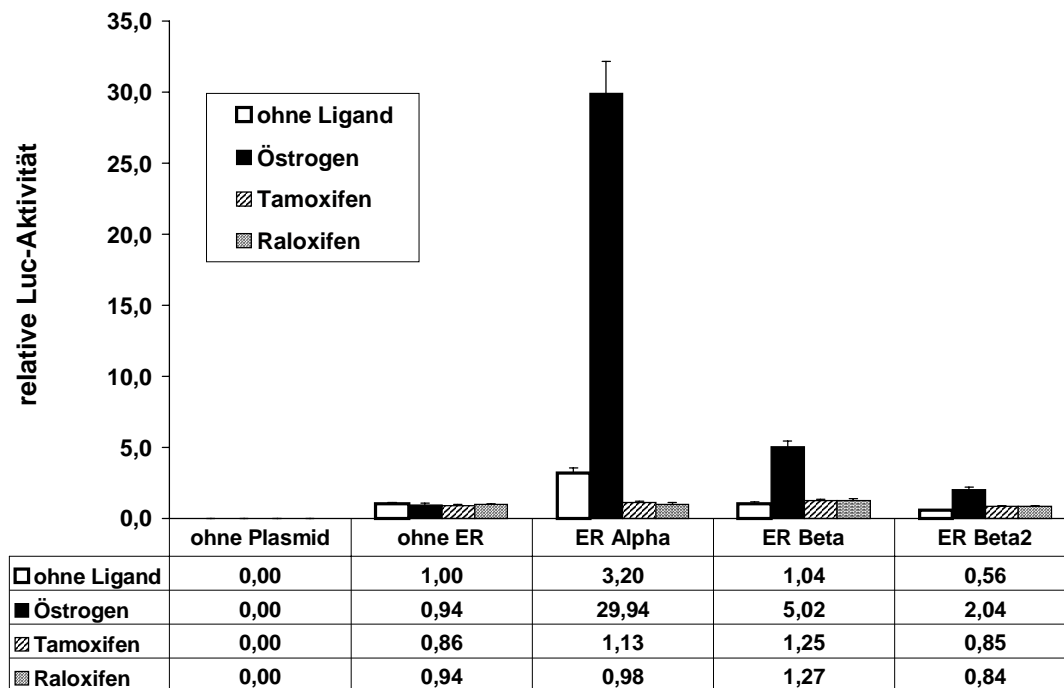


Abbildung 4.1.2.2: Regulation von ERE2-TK-Luc durch ER α , - β , and - β 2 in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3.

SK-BR-3-Zellen wurden transient mit ERE2-TK-Luc, einem ER-Expressionsplasmid und β -Gal-Plasmid transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurden gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Obwohl SK-BR-3-Zellen Östrogenrezeptoren exprimieren (Abbildung 4.1.1.1), kann der endogene ER die Aktivität des Promotors in dieser Zelllinie nicht stimulieren. Eine Östrogen-vermittelte Stimulation kann erst nach Kotransfektion von ER α , ER β oder ER β 2 festgestellt werden. Alle drei Östrogenrezeptoren können den Promotor stimulieren. Wie bereits für U2-OS-Zellen gezeigt, ist dabei ER α effektiver als ER β und ER β effektiver als ER β 2 (Hanstein et al., 1999). Antiöstrogene können die Aktivität des Promotors über keinen der drei Rezeptoren stimulieren.

4.1.3 Regulation von pAP-1-Luc in SK-BR-3-Zellen

Die Östrogen-abhängige Regulation eines Promotors über AP-1-Elemente wurde untersucht. Dazu wurden die Experimente wie oben beschrieben wiederholt, wobei statt ERE2-TK-Luc das Plasmid pAP-1-Luc (Stratagene, La Jolla) transfiziert wurde (Abbildung 4.1.2.1). Der minimal-Promotor dieses Reporter-Plasmides besteht aus einer TATA-Box und sieben AP-1-Elementen. Die Experimente wurden einmal ohne (oben) und einmal mit Kotransfektion von Fos und Jun

Expressionsplasmiden (unten) durchgeführt (Abbildung 4.1.3.1). Als Expressionsplasmide für Fos und Jun wurden die Plasmide pFA-Fos und pFA-Jun der Firma Stratagene verwendet (jeweils 50 ng).

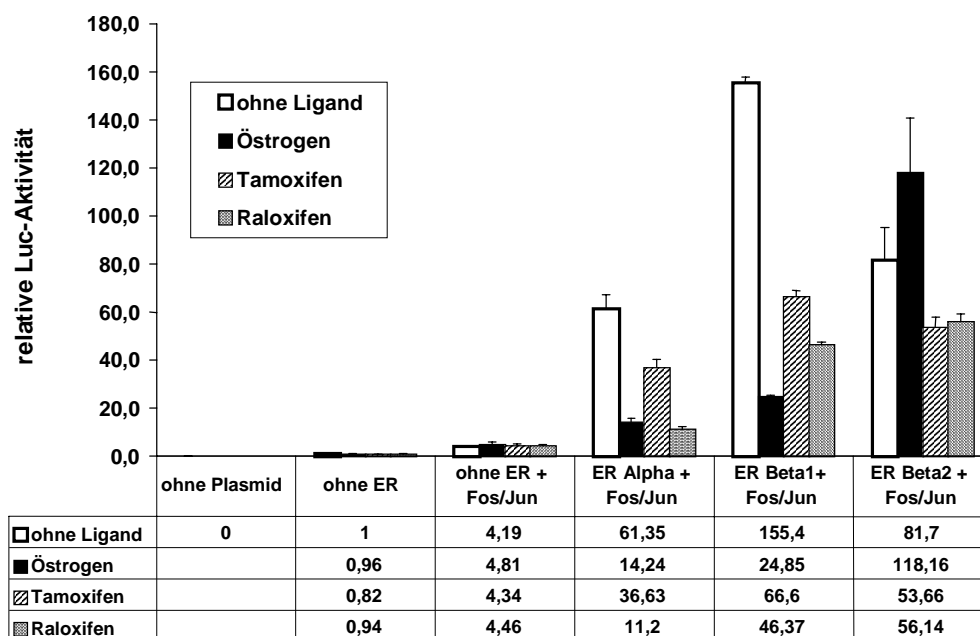
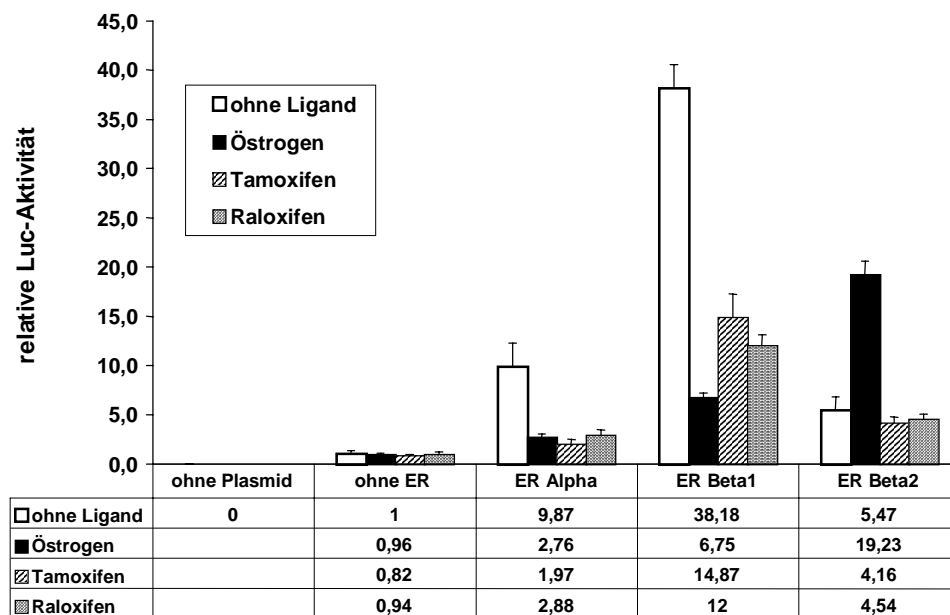


Abbildung 4.1.3.1: Transaktivierung eines AP-1 abhängigen Reportergens durch ER α , ER β und ER β 2 in SK-BR-3-Zellen (oben) und unter Kotransfektion mit Fos und Jun (unten).

SK-BR-3-Zellen wurden transient mit AP-1-Luc, einem ER-Expressionsplasmid und β -Gal-Plasmid transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Unten: Das gleiche Experiment unter Kotransfektion von Fos und Jun.

Wie bei ERE2-TK-Luc kann der endogene ER die Aktivität des Reporters weder mit Östrogen noch mit SERMs modifizieren. Eine Veränderung der Reporteraktivität kann erst nach Kotransfektion der ER-Expressionsplasmide festgestellt werden. Alle drei ERs können die Reporteraktivität ohne Ligand deutlich steigern. Im Vergleich zu den Ansätzen ohne Ligand wird die Reporteraktivität durch Östrogen über ER α und ER β reprimiert. Hingegen kann Östrogen die Aktivität des Reporters über ER β 2 ca. vierfach steigern. Die Antiöstrogene wirken über ER α und ER β reprimierend auf die Promotoraktivität (im Vergleich zu den Ansätzen ohne Ligand). Über ER β 2 zeigen die Antiöstrogene keinen signifikanten Effekt.

Die Kotransfektion von Fos und Jun führt mit und ohne kotransfizierten Östrogenrezeptoren zu einer etwa vierfachen Steigerung der Promotoraktivität (Vergleiche Abbildung A und B). Qualitativ wird die Regulation von AP-1-Luc dadurch jedoch kaum verändert. Bei ER β 2 kommt es zu einer Erhöhung der Promotoraktivität ohne Ligand (vergleiche ER α und ER β). Daher ist die Östrogen-vermittelte Stimulation für ER β 2 weniger ausgeprägt als im Ansatz ohne Fos und Jun.

4.1.4 Regulation von pAP-1-Luc in U2-OS-Zellen

Die Regulation von pAP-1-Luc wurde außerdem in der humanen Osteosarkom-Zelllinie U2-OS untersucht. Da diese Zelllinie durch Lipofektion nicht effektiv transfizierbar ist, wurden die Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Dabei wurden pro Küvette 3 μ g pAP-1-Luc, 1 μ g ER-Expressionsplasmid (pcDNA, ERA α , ERB β oder ERB β 2) und 1 μ g β -Act- β -Gal Expressionsplasmid transfiziert. In einem zweiten Experiment wurden zusätzlich jeweils 0,5 μ g pFA-Fos und pFA-Jun transfiziert. Nach der Elektroporation wurde der Inhalt der Küvetten auf zwei 6-Loch-Platten aufgeteilt. Die Stimulation und Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte wie bei SK-BR-3.

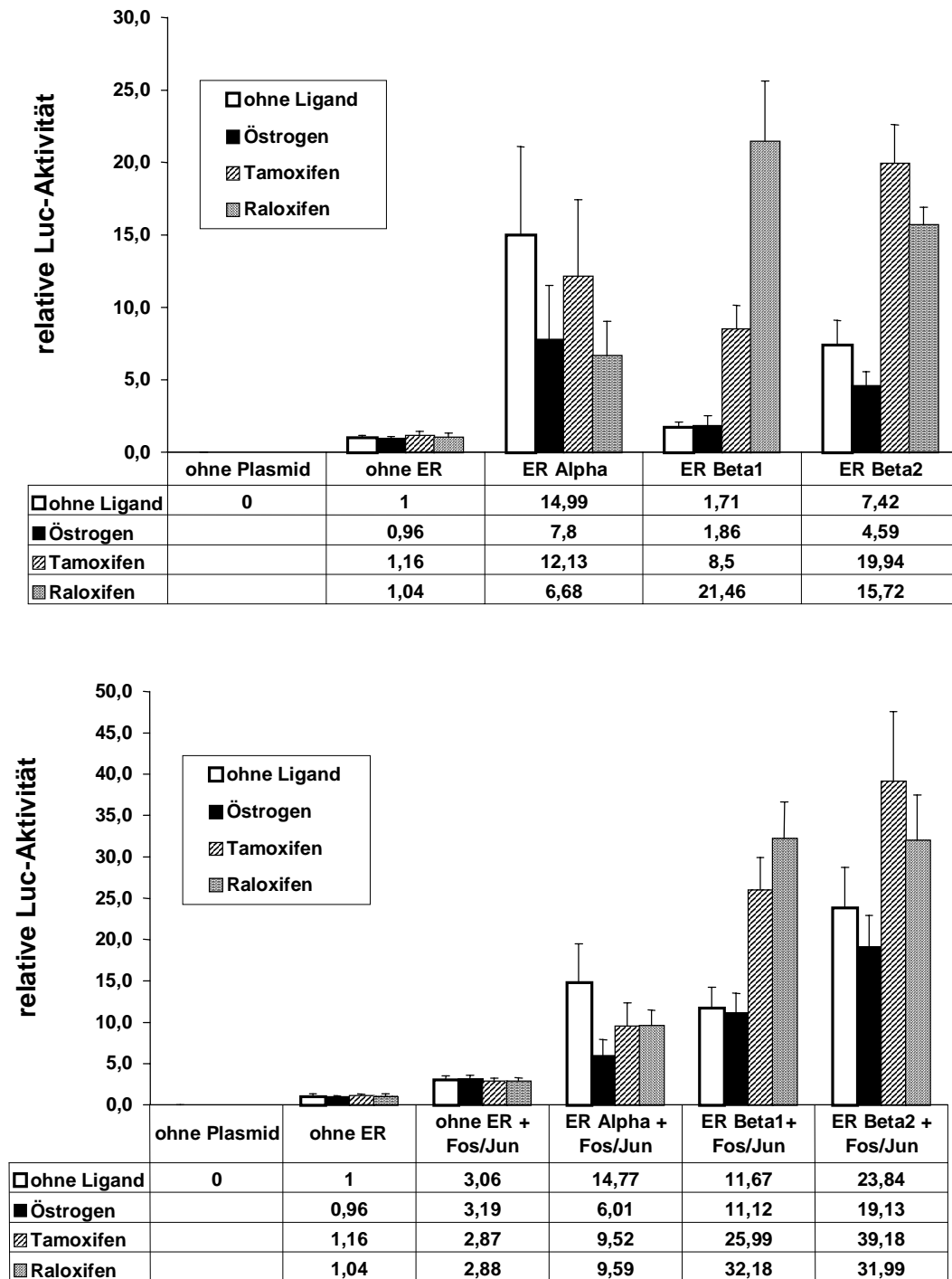


Abbildung 4.1.4.1: Transaktivierung eines AP-1 abhängigen Reportergens durch ER α , ER β und ER β 2 in U2-OS-Zellen (oben) und unter Kotransfektion mit Fos und Jun (unten).

U2-OS-Zellen wurden transient mit pAP-1-Luc, einem ER-Expressionsplasmid und β -Gal-Plasmid transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Unten: Das gleiche Experiment mit Kotransfektion von Fos und Jun.

Wie in SK-BR-3-Zellen, kann auch in U2-OS-Zellen der endogene ER die Aktivität des AP-1 Reporters nicht stimulieren. Die Transfektion der ERs führt ohne Ligand (Basisaktivität) zu einer Erhöhung der Reporter-Gen-Aktivität. Anders als in SK-BR-3-Zellen ist dabei die Basisaktivität von ER α höher als die von ER β . Wie auch für SK-BR-3-Zellen gezeigt, können Östrogen und Antiöstrogene die Reporteraktivität über ER α reprimieren. Hingegen können die Antiöstrogene die Reporter-Aktivität über ER β und ER β 2 deutlich steigern, während Östrogen über ER β neutral und über ER β 2 leicht reprimierend wirkt.

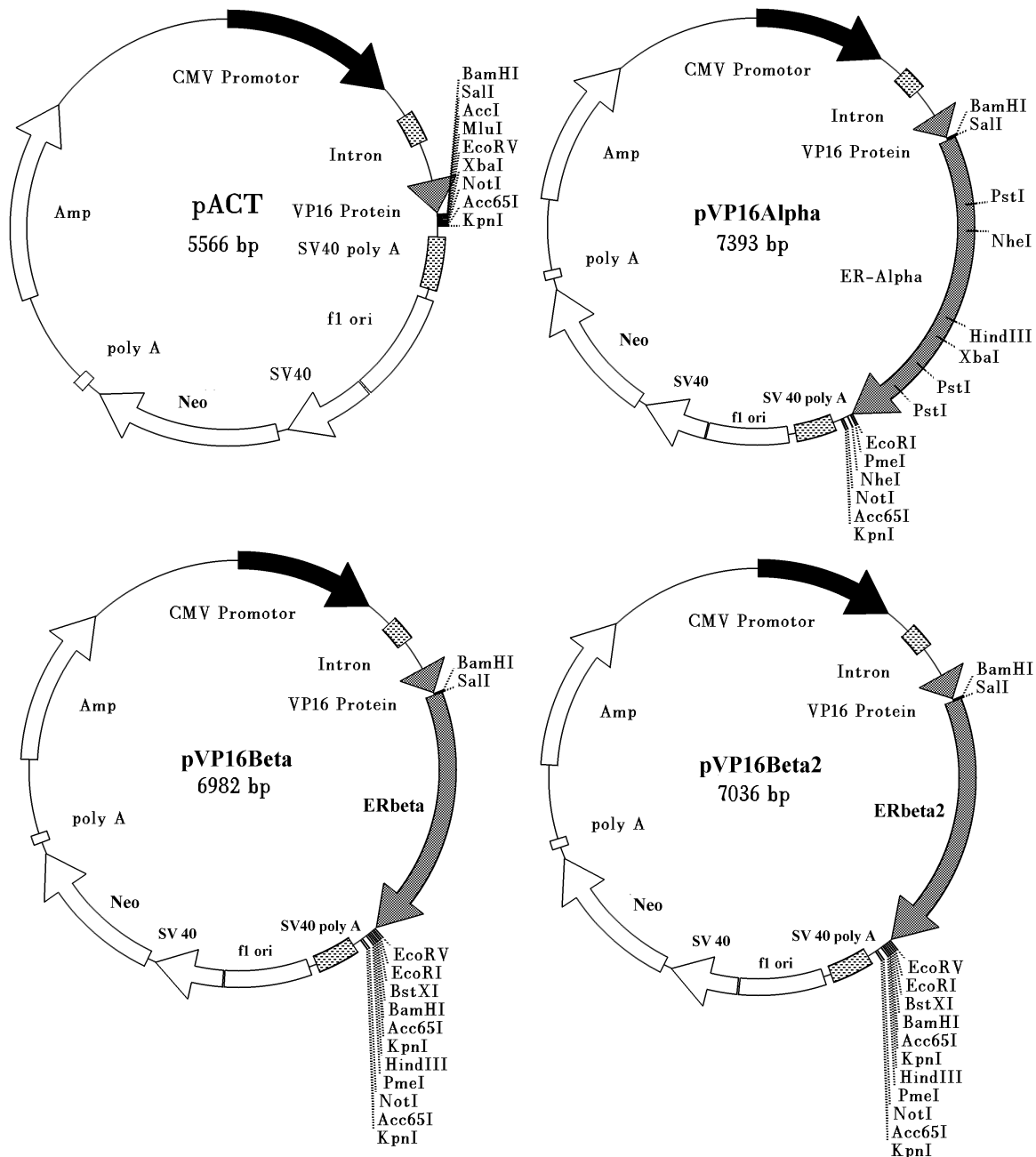
Die Kotransfektion von Fos und Jun führt im Ansatz ohne kotransfizierten ER zu einer etwa dreifachen Erhöhung der Reporter-Gen-Aktivität. Im Ansatz mit ER α kommt es durch die Kofaktoren zu keiner nennenswerten Steigerung der Reporter-Gen-Aktivität. Bei ER β und ER β 2 bewirken die Kofaktoren eine Steigerung der Reporter-Gen-Aktivität mit allen Liganden. Dabei wird im Vergleich zu den Ansätzen ohne Kofaktoren vor allem die Basisaktivität (ohne Ligand) und die Östrogen-vermittelte Aktivität gesteigert. Die Stimulation durch Tamoxifen und Raloxifen, über ER β und ER β 2, fällt daher weniger deutlich aus.

4.1.5 Transaktivierung durch VP-16-Varianten

Es sollte geprüft werden ob die Östrogenrezeptoren direkt mit dem AP-1-Komplex am Promotor des Reporterplasmides interagieren. Zu diesem Zweck wurden ER-Varianten mit einer zusätzlichen Transaktivierungsfunktion erzeugt. Dazu wurden die Gene aus den ER α , ER β und ER β 2 Expressionsvektoren in den Vektor pACT umkloniert. Dieser Vektor enthält zwischen Promotor und multi cloning site die kodierende Sequenz für das virale VP-16-Protein. Dieser Aufbau ermöglicht es das VP-16-Protein mit jedem beliebigen Gen zu fusionieren, welches in die multi cloning site des Vektors integriert wird (Abbildung 4.1.5.1.).

Bei der Konstruktion der VP-16-Varianten der ERs mußte darauf geachtet werden, daß die Leseraster von VP-16-Protein und Östrogenrezeptoren übereinstimmen. Für eine direkte Umklonierung der ER-Gene in pACT waren jedoch keine geeigneten Restriktionsenzym-Schnittstellen vorhanden. Daher mußten vor der Umklonierung geeignete Schnittstellen erzeugt werden. Zu diesem Zweck wurden die Gene für die drei Östrogenrezeptoren zunächst mittels einer PCR amplifiziert. Dabei wurden Primer mit 5' Überhang eingesetzt, die Schnittstellen für *SalI* (5' Primer) und *NheI* (3'Primer) enthalten (3.2.2). Diese Schnittstellen ermöglichen es die PCR-Produkte in den *SalI* und *XbaI* (*NheI* kompatibel) geschnittenen pACT-Vektor zu klonieren. Die 5' Primer wurden dabei so gewählt, daß die kodierenden Sequenzen von VP-16-Protein und Östrogenrezeptoren im gleichen Leseraster liegen. Zwischen dem VP-16-Protein und den ERs ist kein Stopcodon zu finden (Abbildung 4.1.5.1, unten).

Die korrekte Klonierung der Östrogenrezeptoren wurde durch Sequenzierung des Übergangsbereiches von VP-16-Protein und ERs überprüft. Es konnten keine Abweichungen von der zu erwartenden Sequenz gefunden werden (nicht gezeigt).

**VP-16****ER**

...GGATCG CCA GGG ATC CGT CGA CTT ATG...
 Gly Ser Pro Gly Ile Arg Arg Leu Met

Abbildung 4.1.5.1: Vp16-Varianten der Östrogenrezeptoren ER α , ER β und ER β 2.

SV40 3'untranslated Region; Amp: β -lactamase; ColE1: ColE1 Plasmid-Replikationsursprung, fl ori, Plasmid-Replikationsursprung.

Die VP-16-Varianten von ER α , ER β und ER β 2 können den ERE2-TK-Luc Promotor wesentlich effektiver transaktivieren als die WT-Rezeptoren (Abbildung 4.1.5.2. oben, Vergleiche auch Abbildung 4.1.2.2). Im Gegensatz zu den WT-Rezeptoren können die VP16-Varianten das ERE2-Reporterplasmid auch stimulieren, wenn Antiöstrogene als Ligand eingesetzt werden.

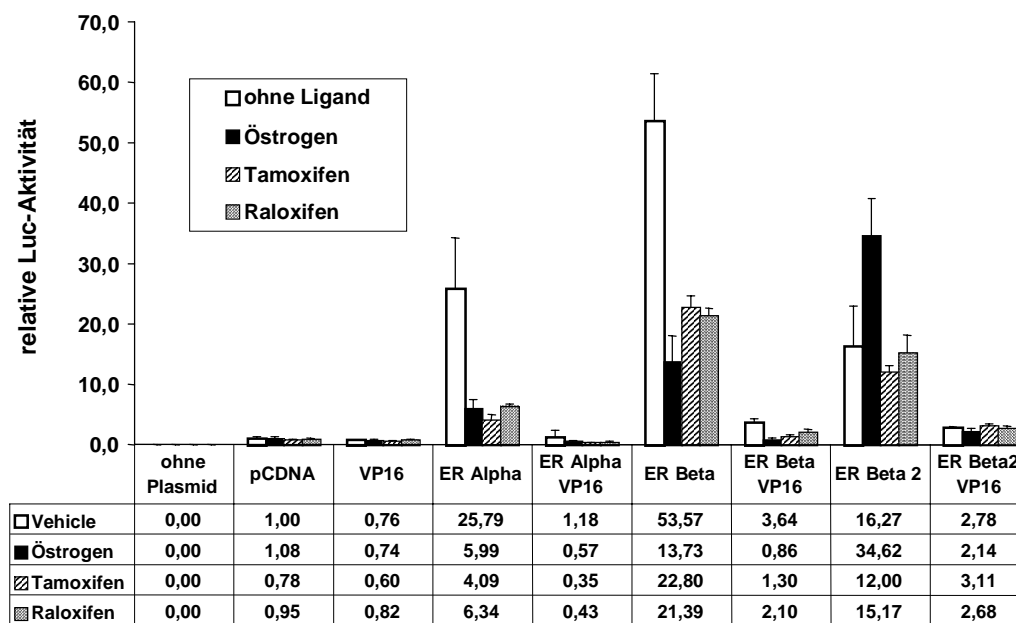
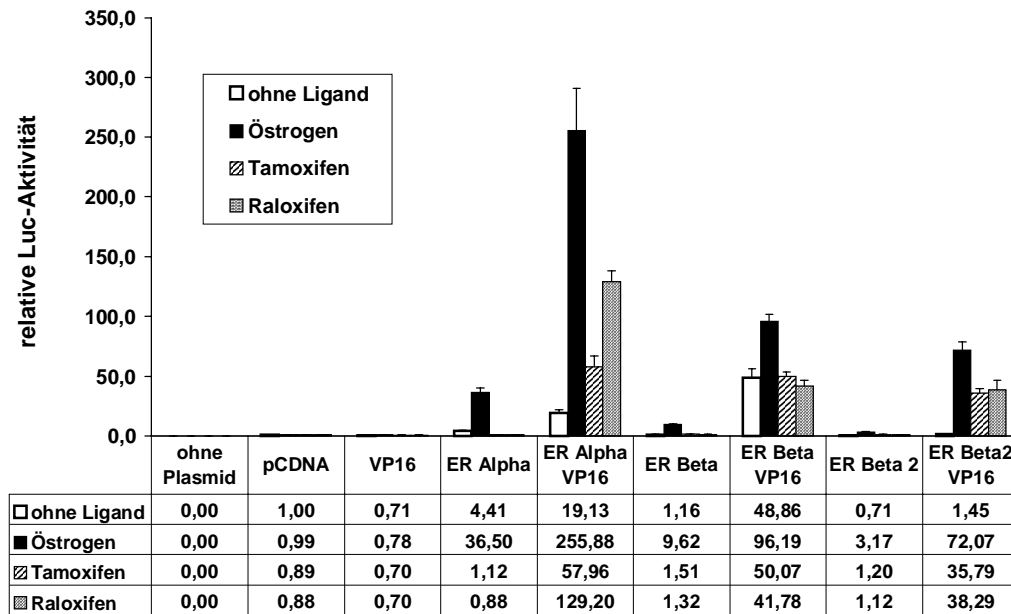


Abbildung 4.1.5.2: Regulation von ERE2-TK-Luc (oben) und pAP-1-Luc (unten) durch VP-16 Östrogenrezeptoren.

SK-BR-3-Zellen wurden transient mit den Reporterplasmiden ERE2-TK-Luc (oben) oder pAP-1-Luc (unten), β -Gal-Plasmid und Expressionsplasmiden für WT-Rezeptoren und Rezeptor-Mutanten transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurden gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Anders als der ERE2-TK-Promotor, wird der pAP-1-Promotor durch die VP-16-Varianten der Östrogenrezeptoren nicht effektiver stimuliert als durch die WT-Rezeptoren. Statt dessen zeigen alle

VP-16-Varianten eine signifikant geringere Aktivität als die korrespondierenden WT-Rezeptoren (Abbildung 4.1.5.1 unten). Durch Transfektion von VP16-ER α wird die Aktivität des AP-1-Promotors sogar unter das Niveau des Ansatzes ohne ER reduziert. Im Gegensatz zum WT-ER β 2 kann die VP16-Variante von ER β 2 den AP-1-Promotor nicht stimulieren.

4.1.6 Bedeutung von AF1 und AF2 bei der Transaktivierung von pAP-1-Luc

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, welche Aktivierungsfunktionen von ER α und ER β an der Regulation von pAP-1-Luc beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde die Regulation von pAP-1-Luc durch ER-Varianten mit Mutationen in den Aktivierungsfunktionen untersucht (Abbildung 4.1.6.1). Neben den WT-Rezeptoren wurde auch eine ER α -Variante ohne AF1-Domäne (ER α Δ AF1, Aminosäuren 125-595), eine ER α -Variante ohne AF2-Domäne (ER α Δ AF2, Aminosäuren 1-534) sowie eine ER β -Variante ohne AF2 (ER β Δ AF2, Aminosäuren 1-439) verwendet (Plasmidkarten siehe Anhang). Die ER α Δ AF2-Variante ist bereits beschrieben worden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Variante keine Affinität zu p160-Kofaktoren wie SRC-1 hat, aber Östrogen binden und dimerisieren kann (Halachmi et al., 1994).

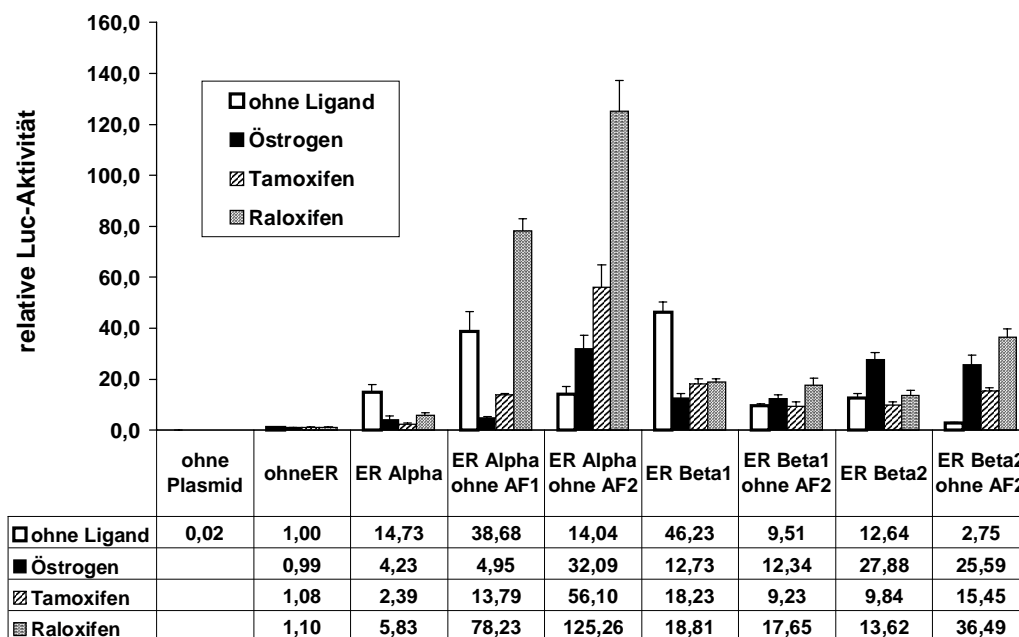


Abbildung 4.1.6.1: Bedeutung der Aktivierungsfunktionen AF1 und AF2 bei der Regulation von pAP-1-Luc.

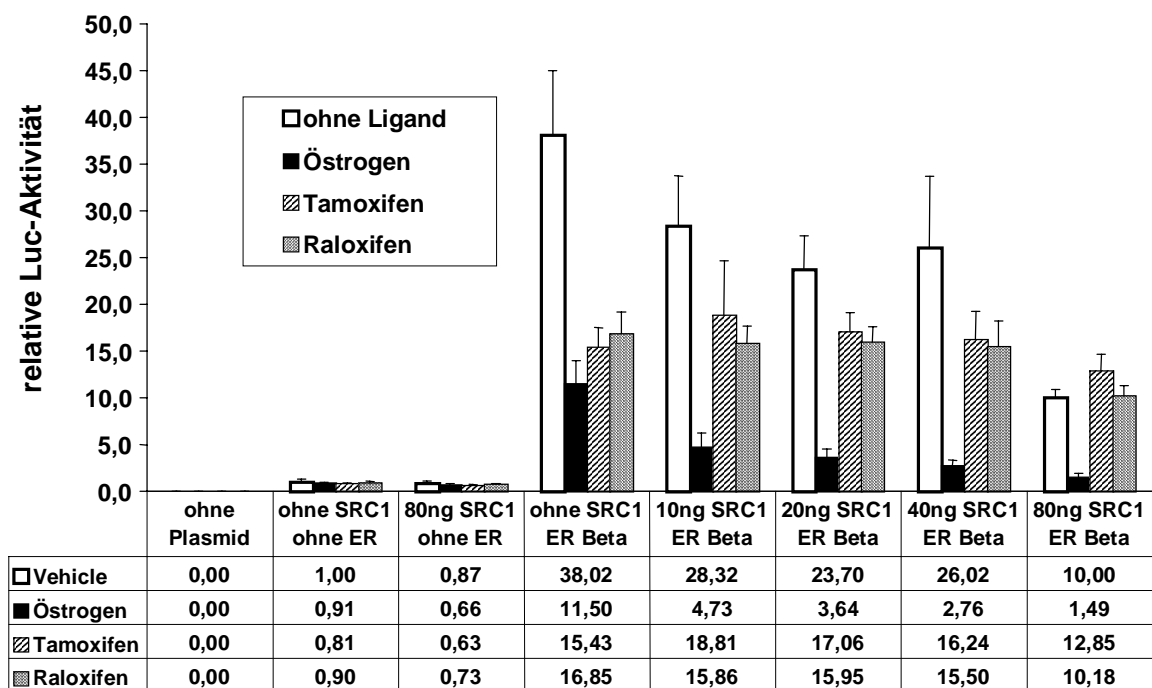
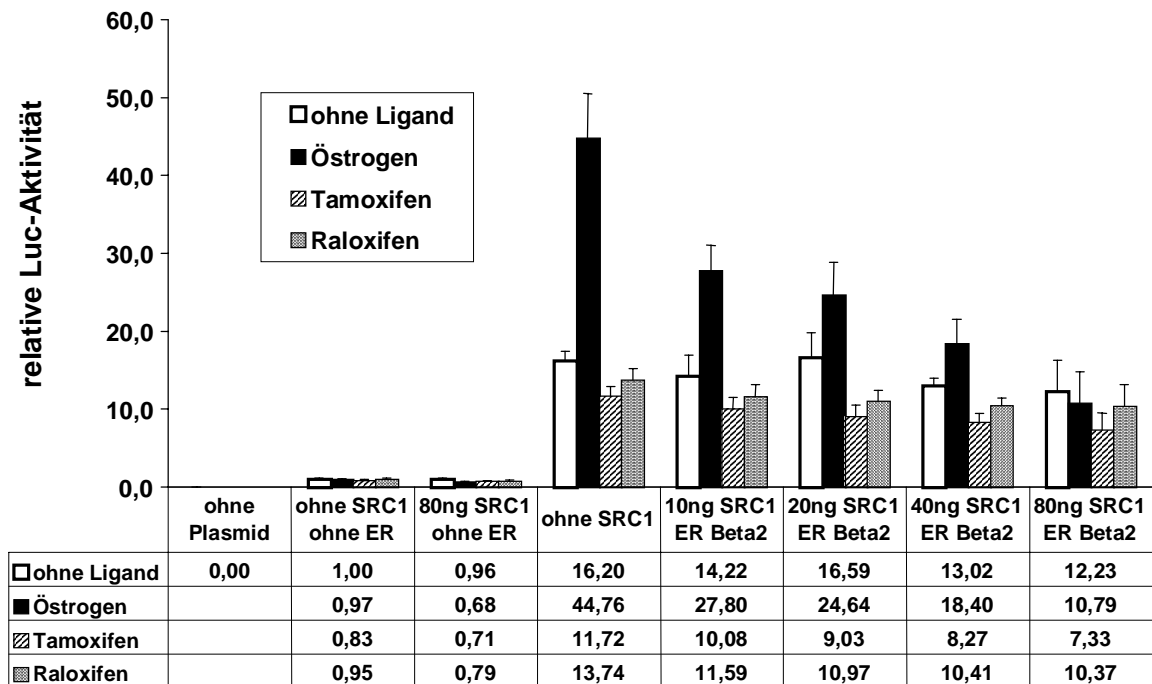
SK-BR-3-Zellen wurden transient mit ERE2-TK-Luc, β -Gal-Plasmid und Expressionsplasmiden für WT-Rezeptoren und Rezeptor-Mutanten transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Östrogen wirkt sowohl über ER α als auch über ER $\alpha\Delta$ AF1 repressiv auf die Promotoraktivität des AP-1 Reporters. Im Gegensatz dazu bewirkt Östrogen über ER $\alpha\Delta$ AF2 eine etwa zweifache Stimulation der Promotoraktivität. Die Basisaktivität von ER $\alpha\Delta$ AF1 (aber nicht von ER $\alpha\Delta$ AF2) ist im Vergleich zu ER α deutlich erhöht. Die Antiöstrogene Tamoxifen und Raloxifen wirken, wie zuvor gezeigt, über ER α repressiv auf die Promotoraktivität. Über ER $\alpha\Delta$ AF2 bewirken sie hingegen eine deutliche Stimulation der Promotoraktivität. Ebenso kann ER $\alpha\Delta$ AF1 die Promotoraktivität mit Raloxifen (aber nicht Tamoxifen) stimulieren.

Bei ER β und ER β 2 führt die Deletion der AF2-Domäne zu einer Reduktion der Basisaktivität. Die Wirkung des Östrogens über ER $\beta\Delta$ AF2 und ER β 2 Δ AF2 ist im Vergleich zu ER β bzw. ER β 2 nicht verändert. Anders als die AF2-defiziente Varianten von ER α zeigen die AF2-defizienten Varianten von ER β keine verstärkte Transaktivierung wenn Antiöstrogene als Ligand eingesetzt werden. Lediglich die Aktivität von ER β 2 Δ AF2/Raloxifen ist leicht erhöht.

4.1.7 SRC-1 vermittelt die Repression über ER β /E2

Es sollte gezeigt werden, warum Östrogen die Aktivität des AP-1-Reporters in SK-BR-3-Zellen über ER β reprimiert aber über ER β 2 stimuliert. ER β und ER β 2 unterscheiden sich vor allem in ihrer Affinität zu p160-Koaktivatoren wie z.B. SRC-1 (Hanstein et al., 1999). In Pull-down Assays konnte eine Östrogen-induzierte Bindung von SRC-1 an die Ligandenbindungsdomäne von ER β aber nicht ER β 2 gezeigt werden. Die Bindung von p160-Koaktivatoren ist essentiell für die Transaktivierung von Promotoren, die ERE-Elemente enthalten (Halachmi et al., 1994). Es wurde daher postuliert, daß die p160-Koaktivatoren auch bei der Regulation von Promotoren mit AP-1-Elementen eine wichtige Rolle spielen (Webb et al., 1999). Wir wollten überprüfen, ob die Aktivität der verschiedenen ERs durch Kotransfektion mit SRC-1 modifiziert wird. Dazu wurden die Experimente in SK-BR-3-Zellen wiederholt, wobei zusätzlich zwischen 0 und 80 ng SRC-1-Expressionsplasmid kotransfiziert wurden (Abbildung 4.1.7.1). Bei jedem Ansatz wurde die an 100 ng fehlende Menge an SRC-1-Plasmid mit pcDNA aufgefüllt. Insgesamt wurden also 0,6 μ g Plasmide pro Loch transfiziert. Die Plasmidkarte des SRC-1-Expressionsplasmides ist im Anhang zu finden.



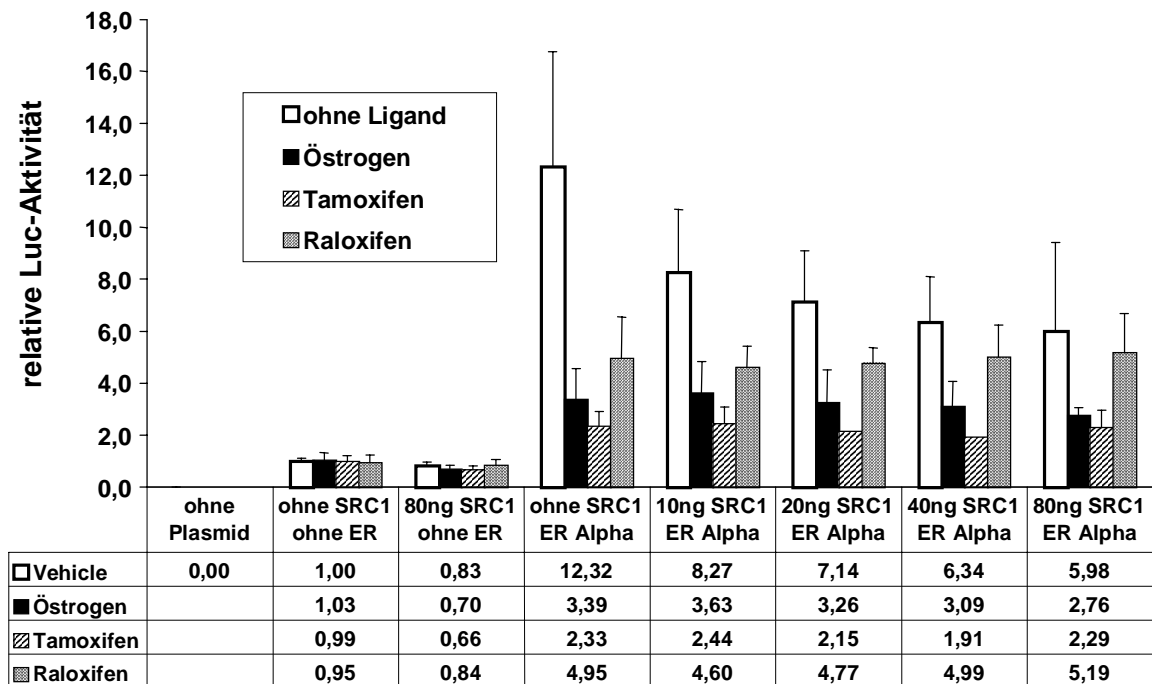


Abbildung 4.1.7.1: Einfluß von SRC-1 auf die Transaktivierung von pAP-1-Luc durch ER β 2 (oben), ER β (Mitte) und ER α (unten).

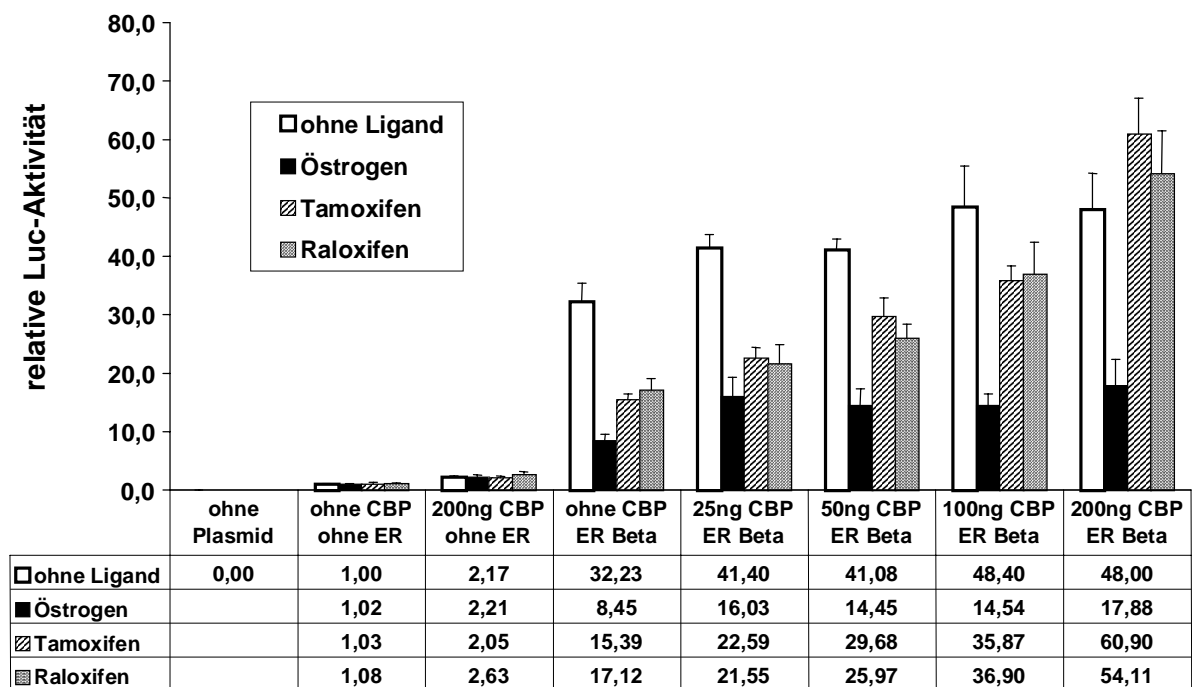
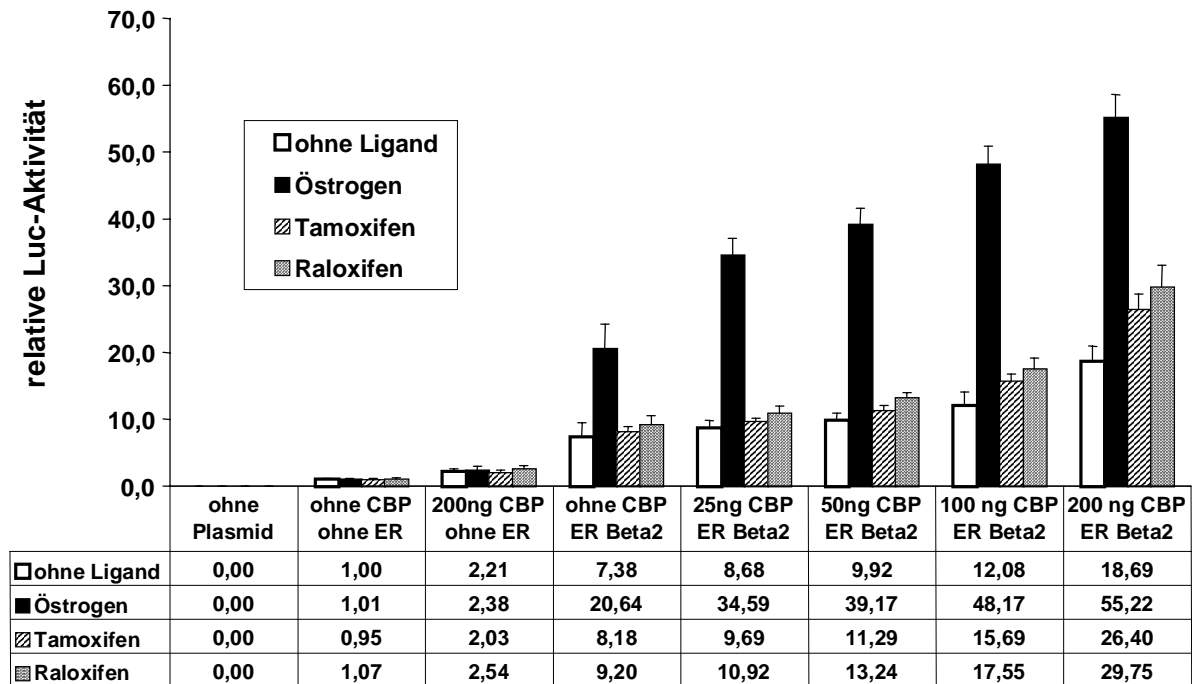
SK-BR-3-Zellen wurden transient mit ERE2-TK-Luc, ER- und SRC-1-Expressionsplasmiden, und β -Gal-Plasmid transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Die Östrogen-abhängige Stimulation von pAP-1-Luc durch ER β 2 wird durch SRC-1 dosisabhängig reprimiert. Bei 80 ng SRC-1 ist die durch Östrogen vermittelte Stimulation vollständig aufgehoben (oben). Unerwarteter Weise kann SRC-1 die Repression durch ER β /E2 dosisabhängig verstärken (Mitte). Zu unserer Überraschung können auch hohe Dosen an SRC-1 die Aktivität von ER α /E2 nicht modifizieren. (unten). Die Basisaktivität von ER β 2 wird durch SRC-1 nicht beeinflusst. Hingegen werden die Basisaktivitäten von ER β und ER α durch SRC-1 reduziert. Die Wirkung der Antiöstrogene wird bei keinem der drei ERs verändert.

4.1.8 CBP stimuliert die Transaktivierung durch Antiöstrogene über ER β

Neben den p160-Koaktivatoren spielen auch die 300 kDa großen Koaktivatoren CBP und p300 eine wichtige Rolle bei der Transaktivierung von Promotoren mit ERE-Elementen (Hanstein et al., 1996). Wir wollten untersuchen, welchen Einfluß CBP auf die Regulation von pAP-1-Luc durch die verschiedenen Östrogenrezeptoren hat. Dazu wurden die Experimente wie zuvor beschrieben

wiederholt, wobei neben den Östrogenrezeptoren zusätzlich zwischen 0 und 200 ng an CBP Expressionsplasmid transfiziert wurden (Abbildung 4.1.8.1). Die an 200 ng fehlende Menge an CBP-Expressionsplasmid wurde mit pcDNA aufgefüllt. Insgesamt wurden 0,7 µg DNA pro Loch (einer 12-Loch Platte) transfiziert. Die Plasmidkarte des CBP-Expressionsplasmides ist im Anhang zu finden.



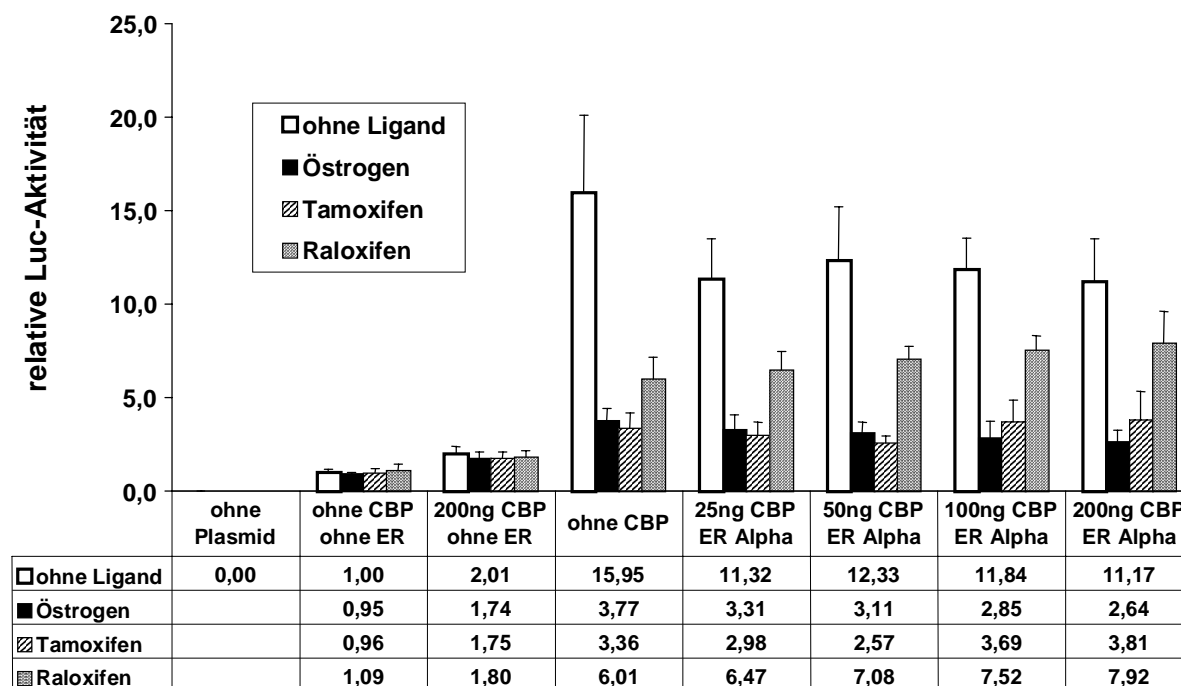


Abbildung 4.1.8.1: Einfluß von CBP auf die Transaktivierung von pAP-1-Luc durch ER β 2 (oben), ER β (Mitte) und ER α (unten).

SK-BR-3-Zellen wurden transient mit ERE2-TK-Luc, ER- und CBP-Expressionsplasmiden, und BetaAct/Gal-Plasmid transfiziert, stimuliert und die Luciferase bzw. die β -Gal-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde gegen die β -Gal-Aktivität normalisiert. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne ER) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

CBP steigert dosisabhängig sowohl die Basisaktivität von ER β 2 als auch die Aktivität mit allen drei Liganden. Die Regulation von pAP-1-Luc wird dabei jedoch qualitativ kaum verändert (oben). Bei ER β führt die Kotransfektion von CBP vorrangig zu einer verstärkten Stimulation durch die Antiöstrogene. Die Basisaktivität wird durch steigende Mengen an CBP nur unwesentlich gesteigert. Bei 200 ng CBP ist daher die Aktivität der Antiöstrogene über ER β größer als die Basisaktivität. Die Transaktivierung durch E β /E2 wird durch CBP ebenfalls nur mäßig gesteigert. Dieser Effekt ist bereits bei 25 ng maximal und kann durch größere Mengen CBP nicht weiter gesteigert werden (Mitte). Auf die Transaktivierung durch ER α hat CBP keinen signifikanten Effekt. Lediglich die Basisaktivität wird durch CBP leicht reprimiert (unten).

4.1.9 ER β 2 wird in humanen Tumoren nicht exprimiert

ER β 2 konnte bislang nur bei Nagern nachgewiesen werden. Wir wollten die Expression von ER β 2 mittels einer RT-PCR in humanem Geweben nachweisen. Dazu wurden Primer verwendet, die in den

Exons 5 und 6 lokalisiert sind (3.2.2). Das zu erwartende ER β PCR-Produkt ist 171 bp groß. Da bei ER β 2 ein zusätzliches Exon von 54bp zwischen Exon 5 und Exon 6 integriert ist, kann bei der gleichen PCR außerdem ein 225 bp großes ER β 2 PCR-Produkt amplifiziert werden. Als interner Standard wurden der PCR-Reaktion nach 5 Zyklen GAPDH-Primer zugesetzt (PCR-Produkt:195 bp). Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem Acrylamidgel unter Verwendung eines A.L.F.-DNA-Sequenzierautomaten (Abbildung 4.1.9.1).

PCR-Bedingungen für den β 2-Nachweis

PCR-Produkt	PCR-Ansatz	Amplifikation
ER β : 171 bp	1 x PCR-Puffer	1 x 10 Minuten.
ER β 2: 225 bp	150 μ m dNTPs	34/27 x 1 Minute 94°C
GAPDH: 195 bp (27 Zyklen)	40 pmol ER β -Primer	1 Minute 58°C
	30 pmol GAPDH-Primer	1 Minute 72°C
	2,5 U Taq-DNA-Polymerase	1 x 8 Minute 72°C
	Reaktionsvolumen: 50 μ l	

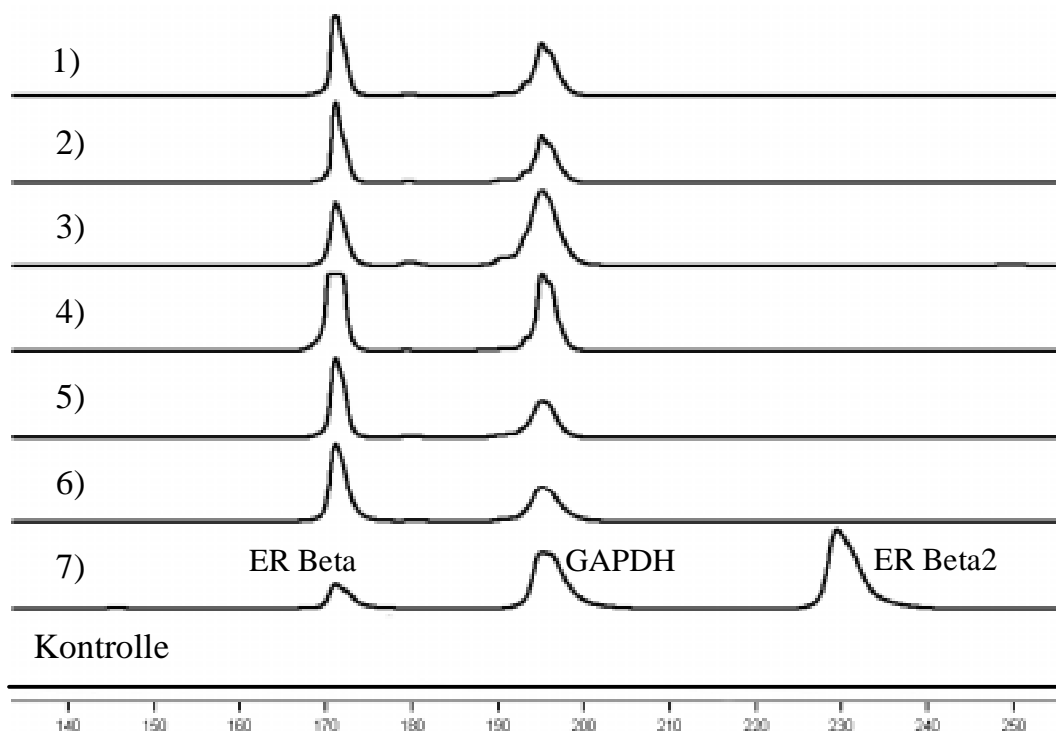


Abbildung 4.1.9.1: ER β 2 wird in humanen Ovarialkarzinomen nicht exprimiert.

Elektrophoretogramm der RT-PCR zum Nachweis der Expression von ER β und ER β 2 in verschiedenen Ovarialkarzinomen (1-6). Spur 7: Positivkontrolle (cDNA aus CHO-Zellen). Spur 8: Negativkontrolle (PCR ohne cDNA).

Es wurden cDNAs aus 11 ER β positiven Geweben überprüft, davon 4 Ovarialkarzinome, 2 Ovar-Normalgewebe und 5 Mammakarzinome. Eine Expression von ER β 2 konnte - trotz teilweise hoher ER β Expression - in keinem der untersuchten Tumore nachgewiesen werden. In der Hamster-Ovar-Zelllinie CHO wird ER β 2 hingegen signifikant höher exprimiert als ER β (Spur 7). Die Identität der amplifizierten PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung bestätigt (nicht gezeigt).

Während der Durchführung dieser Experimente wurden weitere Arbeiten veröffentlicht, die zeigen, daß ER β 2 in humanen Geweben nicht exprimiert wird. Auf eine Untersuchung von weiteren cDNAs aus anderen Geweben wurde daher verzichtet.

4.2 Regulation der Progesteronrezeptor-Promotoren

4.2.1 Konstruktion von Reporter-Plasmiden

Die Regulation der beiden Promotoren des Progesteronrezeptors wurde untersucht. Dazu wurden Luciferase-Reporterplasmide konstruiert, die den distalen (PR_A) bzw. den proximalen Promotor (PR_B) des Progesteronrezeptors enthalten (Abbildung 4.2.1.1.) Die beiden Promotoren wurden dazu zunächst aus chromosomaler humaner DNS mittels PCR amplifiziert (Primer siehe 3.2.2, 30 Zyklen: 94°C 1 Minute, 62°C 2 Minute, 72°C 1 Minute). Die amplifizierten Fragmente entsprechen den Basenpaaren -647 - +30 (PR_B) und +438 - +1084 (PR_A) bezogen auf das erste Startcodon des PR-Genes. Zur Amplifikation der beiden Promotoren wurde die ExpandTM DNS-Polymerase (Roche) verwendet. Diese besteht aus einem Gemisch von Taq- und Pwo-DNS-Polymerase und hat aufgrund der Exonucleaseaktivität der Pwo-Polymerase eine deutlich geringere Fehlerrate als reine Taq DNS-Polymerase. Da die amplifizierten Promotoren keine für eine Klonierung geeignete Restriktionsschnittstelle enthalten, wurden die beiden Promotoren unter Verwendung von modifizierten Primern amplifiziert, die bei der PCR zur Generierung von Schnittstellen an den Flanken der Promotoren führt (Primer siehe Tab 3.2). Die PCR-Produkte konnten daher mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Hind*III geschnitten und in die korrespondierenden Schnittstellen des Reporterplasmides pGL2-Basic kloniert werden. Das Reporterplasmid pGL2-Basic enthält ein AP-1-Element, welches die Ergebnisse der nachfolgenden Experimente verfälschen kann. Da das AP-1-Element in einem nicht funktionellen Bereich von pGL2-Basic lokalisiert ist, kann dieses eliminiert werden. Dazu wurden PRA-Luc und PRB-Luc über eine PCR amplifiziert, bei der lediglich die AP-1-Elemente ausgespart wurden. Über *Pst*I-Schnittstellen in den Flanken der beiden Primer konnten die beiden Plasmide rezirkularisiert werden (Primer siehe Tabell 3.2). Die Eliminierung der beiden AP-1-Elemente wurde durch Restriktionsanalyse mit *Hind*III und *Pst*I überprüft (nicht gezeigt). Um zu zeigen, daß die Sequenzen beider Promotoren ohne Fehlamplifikationen kloniert wurden, wurden die Promotoren beider Plasmide sowohl in sense als auch in antisense Richtung sequenziert. Dabei wurden Primer verwendet, die die MCS von pGL2-Basic flankieren und zusätzlich M13 Sequenzen

enthalten, die eine Sequenzierung unter Standard-Bedingungen ermöglicht (Sequenzierung siehe 3.8., Primer siehe 3.2.2). Es konnten keine Abweichungen von den publizierten Sequenzen der Promotoren gefunden werden (Kastner et al., 1990) (nicht gezeigt).

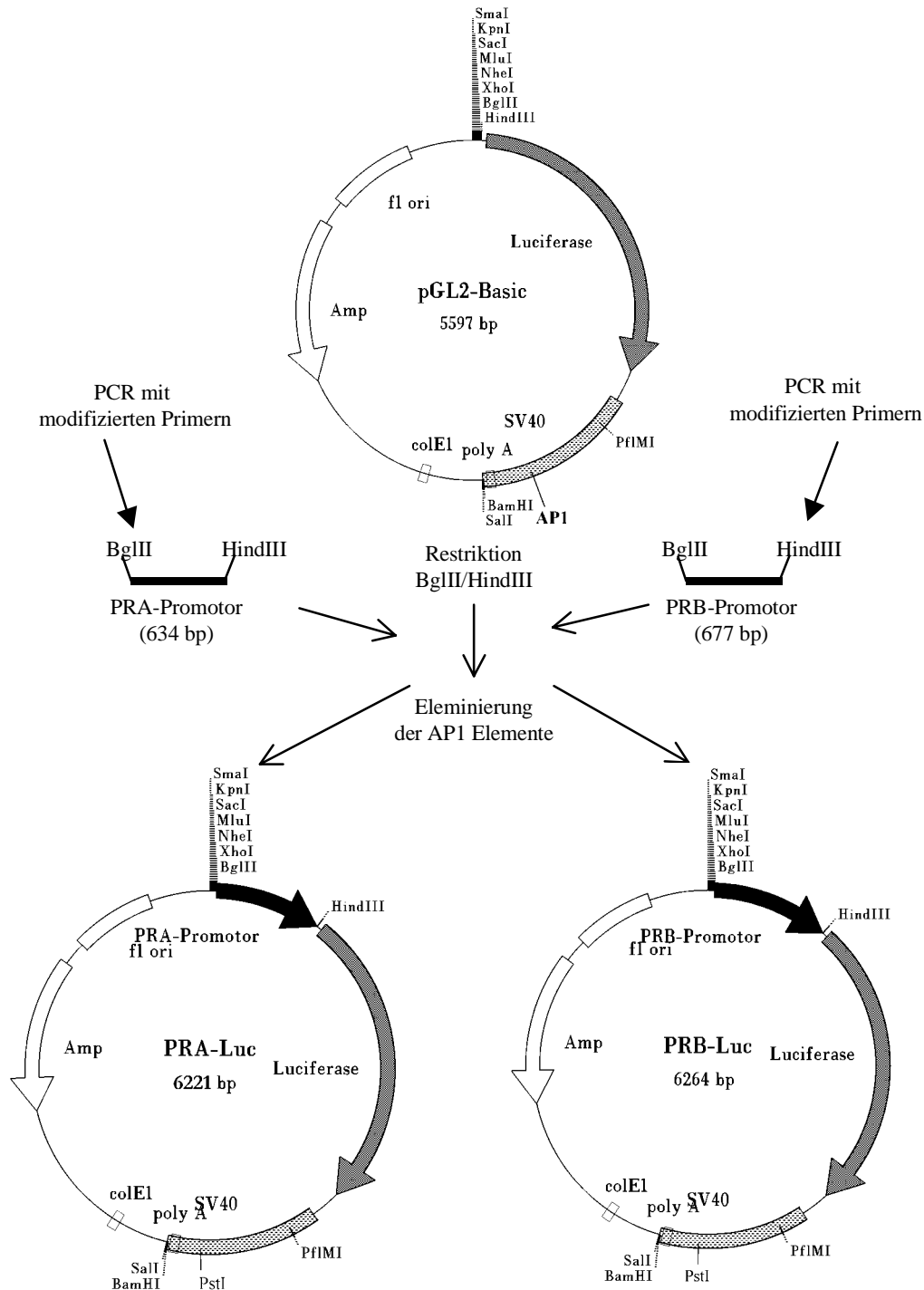


Abbildung 4.2.1.1: Konstruktion der Reporterplasmide PRA-Luc und PRB-Luc.

Erläuterungen siehe Text. SV40: SV40 3'untranslated Region; Amp: β -lactamase; ColE1: ColE1 Plasmid-Replikationsursprung; fl ori: Plasmid-Replikationsursprung.

4.2.2 Regulation von PR_A durch ER α und ER β

Um die Regulation von PR_A zu studieren, wurde die Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa in 12-Loch Platten ausgesät und mit dem Reporterplasmid PRA-Luc, den Expressionsplasmiden für verschiedene Östrogenrezeptoren (pERAlpha, pERBeta, pERBeta2 oder pcDNA) und BetaAct/Gal-Plasmid (als interner Standard) transfiziert. Da das Phenolrot aus dem Zellkulturmedium einen östrogenen Effekt hat, wurden die Zellen zunächst für zwei Tage ohne Phenolrot kultiviert, und dann in 12-Loch Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter Verwendung von FugeneTM (Roche) mit 400 ng Reporterplasmid, 50 ng ER-Expressionsplasmiden und 50 ng β -Act- β -Gal transfiziert und für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Östrogen, Tamoxifen oder Raloxifen stimuliert (Endkonzentration im Medium jeweils 10^{-7} M). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferase und β -Gal-Reporteraktivität gemessen. Die Abbildung 4.2.2.1. zeigt die Regulation des PRA-Promotors in Ishikawa-Zellen.

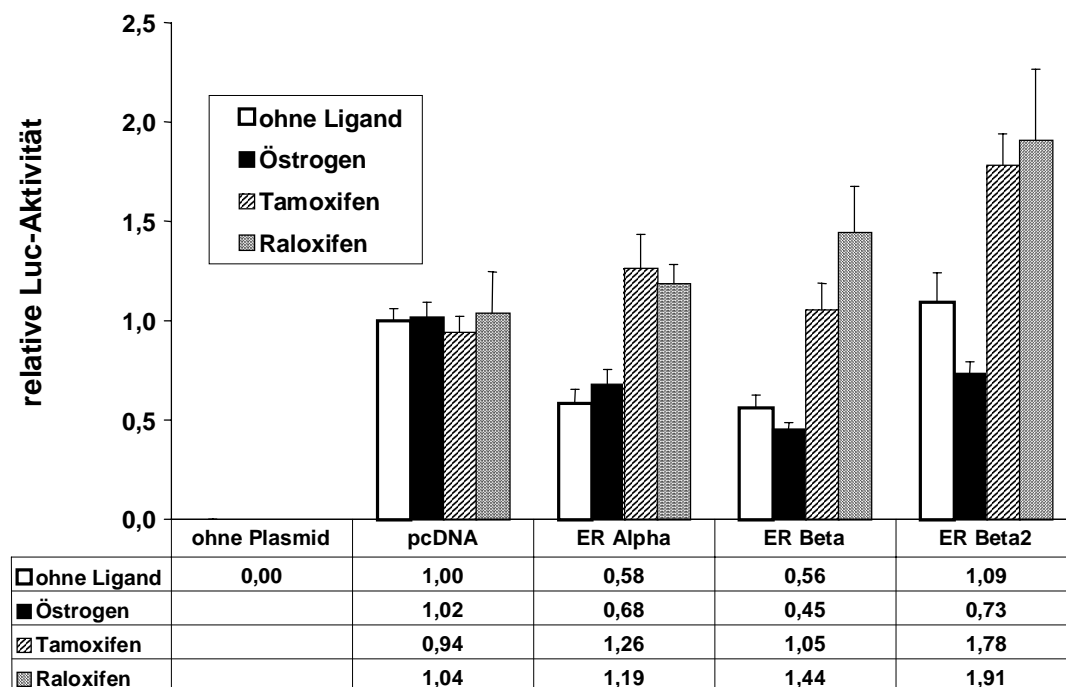


Abbildung 4.2.2.1: Die Regulation des distalen PR-Promotors (PR_A) in Ishikawa-Zellen.

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerindikatoren zeigen die mittlere Standardabweichung aus allen drei Experimenten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz ohne kotransfizierten ER gleich 1 gesetzt.

Wie erwartet, ließ sich ohne Transfektion eines Reporterplasmides keine Luciferase-Aktivität nachweisen. Wird PRA-Luc mit pcDNA kotransfiziert, so lässt sich Luciferase Aktivität nachweisen, diese kann jedoch durch die unterschiedlichen Liganden nicht modifiziert werden. Durch Transfektion von ER α und ER β wird die Promotoaktivität leicht reprimiert. Die Repression kann durch

Antiöstrogene aufgehoben werden. Östrogen scheint die Expression weder über ER α noch über ER β zu beeinflussen.

Um die Regulation in verschiedenen Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurde das Experiment in HeLa-Zellen wiederholt. Die Abbildung 4.2.2.2. zeigt die Regulation des distalen PR-Promotors in HeLa-Zellen. In dieser Zelllinie zeigt ER α keinen nennenswerten Einfluß auf die Luciferase Aktivität. ER β kann die Promotoraktivität reprimieren, wenn Östrogen als Ligand eingesetzt wird.

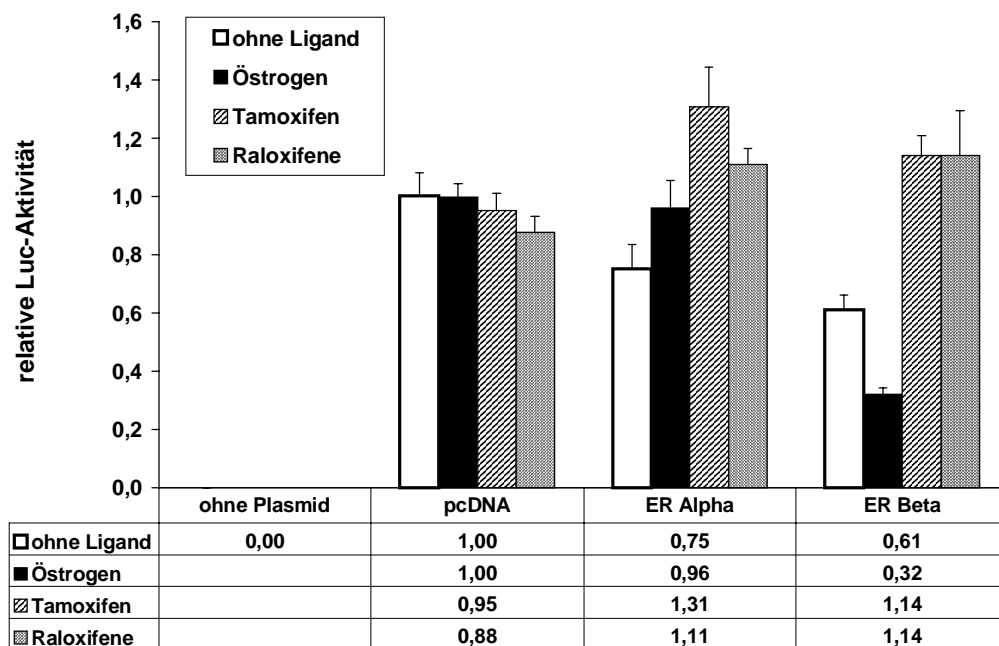


Abbildung 4.2.2.2: Regulation des distalen PR-Promotors (PR_A) in HeLa-Zellen.

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Indikatoren auf den Säulen zeigen die mittlere Standardabweichung aus allen drei Experimenten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz ohne kotransfizierten ER gleich 1 gesetzt.

4.2.3 Regulation von PR_B durch ER α und ER β

Die für PR_B-Luc beschriebenen Experimente wurden auf identische Weise mit dem Reporterplasmid PR_B-Luc wiederholt. Die Abbildung 4.2.3.1. zeigt die Regulation des proximalen PR-Promotors (PR_B) in Ishikawa-Zellen.

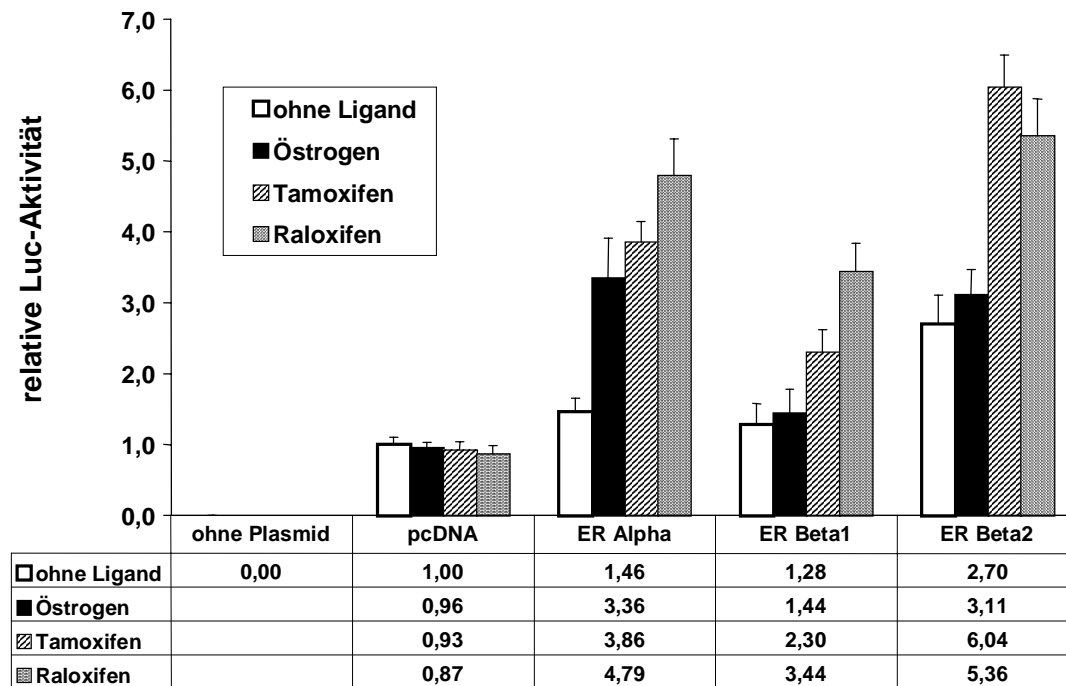


Abbildung 4.2.3.1: Regulation des proximalen PR-Promotors (PR_B) in Ishikawa-Zelllinien.

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Indikatoren auf den Säulen zeigen die mittlere Standardabweichung aus allen sechs Experimenten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne Ligand) ohne kotransfizierten ER gleich 1 gesetzt.

Wie bei PRA-Luc lässt sich auch bei PRB-Luc eine ligandenabhängige Modifikation der Reportergen-Aktivität erst nach Kotransfektion mit den Expressionsplasmiden nachweisen, obwohl bekannt ist, daß Ishikawa-Zellen Östrogenrezeptoren exprimieren (Holinka et al., 1987)(Abbildung 4.1.1.1). Nach Kotransfektion von ER α können sowohl Östrogene als auch Antiöstrogene die Aktivität von PR_B steigern. Dabei sind die Antiöstrogene geringfügig aktiver als Östrogen. Interessanterweise ist Östrogen nicht in der Lage, die Promotoraktivität zu steigern, wenn ER β statt ER α kotransfiziert wird. Die beiden Antiöstrogene können hingegen die Aktivität des PRB-Promotors auch über ER β stimulieren.

Die Östrogen-abhängige Regulation von Promotoren die kein ERE-Element enthalten, ist als Zelllinien-spezifisch beschrieben. So konnte z.B. gezeigt werden, daß Tamoxifen Promotoren mit AP-1-Elementen in Ishikawa-Zellen aber nicht in anderen Zelllinien stimulieren kann (Paech et al., 1997). Daher wurden die Experimente in HeLa-Zellen wiederholt. Dabei wurde auf die Transfektion mit ER β 2 verzichtet, statt dessen wurde ER α VP16 kotransfiziert. Es wurden identische Mengen an Reporterplasmiden und Expressionsplasmiden wie bei Ishikawa-Zellen verwendet. Die Abbildung 4.2.3.2. zeigt die Regulation des proximalen PR-Promotors (PR_B) in HeLa-Zellen.

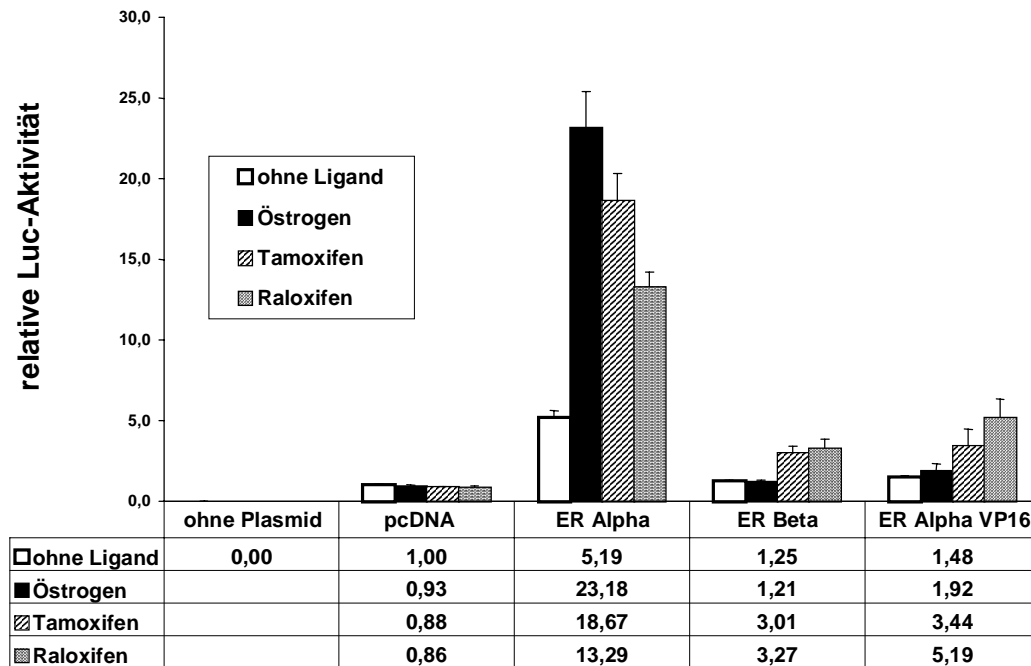


Abbildung 4.2.3.2: Regulation des proximalen PR-Promotors (PR_B) in HeLa-Zellen

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Indikatoren auf den Säulen zeigen die mittlere Standardabweichung aus allen drei Experimenten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne Ligand) ohne kotransfizierten ER gleich 1 gesetzt

Die ER-vermittelte Transaktivierung des PR_B-Promotors in HeLa-Zellen zeigt deutliche Parallelen zur Transaktivierung in Ishikawa-Zellen. Die Aktivität von ER α ist in dieser Zelllinie jedoch deutlich höher als die von ER β . In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Ishikawa-Zellen kann Östrogen die Aktivität des PR_B-Promotors nur über ER α , nicht aber über ER β steigern. Die Antiöstrogene können die Aktivität von PR_B-Luc über beide ERs stimulieren. Anders als bei Ishikawa-Zellen ist Östrogen dabei jedoch wirksamer als Tamoxifen und Raloxifen. Die VP-16-Variante von ER α kann PR_B kaum beeinflussen.

4.2.4 Bedeutung von AF1 und AF2 für die Regulation von ERE2-TK-Luc

In weiteren Experimenten haben wir die Rolle der Aktivierungsfunktionen AF1 und AF2 bei der Transaktivierung durch ER α und ER β untersucht. Dazu wurden zunächst verschiedene Varianten des ER auf Ihre Aktivität auf einen Promotor mit ERE-Elementen untersucht (Abbildung 4.2.4.1). Dabei wurden die bereits beschriebenen AF1- bzw. AF2-defizienten ER-Varianten verwendet (vergleiche Abschnitt 4.1.6). Die Transfektion der Ishikawa-Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

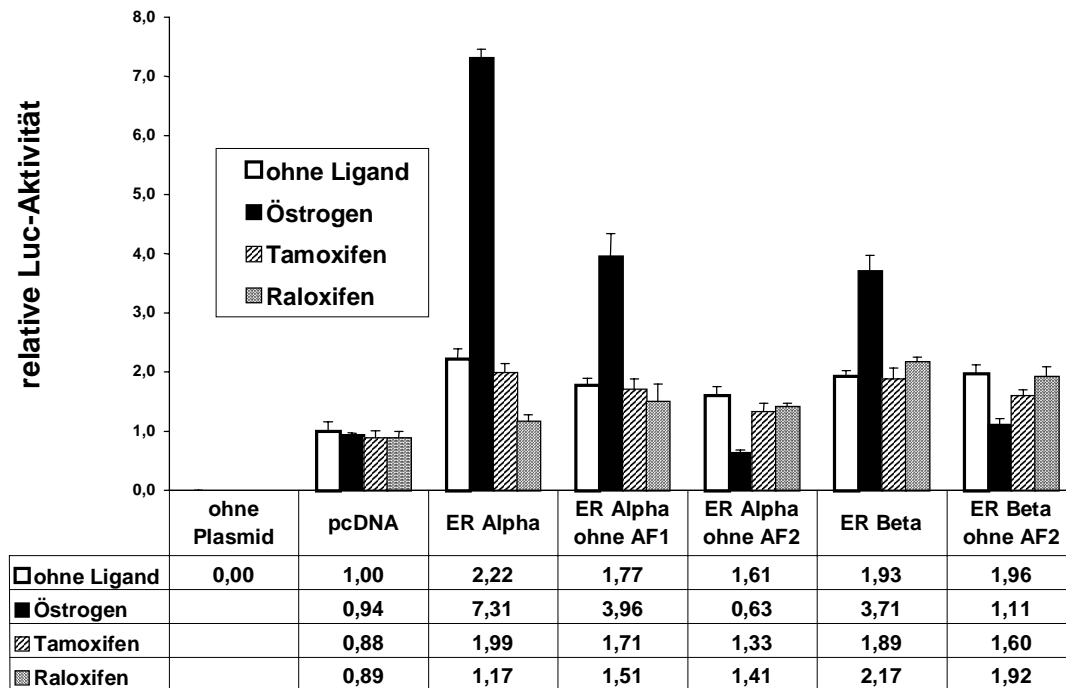


Abbildung 4.2.4.1: Regulation von ERE2-TK-Luc in Ishikawa-Zellen.

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Indikatoren auf den Säulen zeigen die mittlere Standardabweichung aus allen drei Experimenten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne Ligand) ohne kotransfiziert ER gleich 1 gesetzt.

Wie beim PRB-Promotor, können Östrogen und Antiöstrogene die Aktivität des ERE2-TK-Promotors nicht modifizieren, wenn kein ER-Expressionsplasmid kotransfiziert wurde. Wie bereits zuvor gezeigt, wirkt Östrogen über ER α und ER β als Agonist der Promotoraktivität von Promotoren mit ERE-Elementen (Fig 3A) (Hanstein et al., 1996). Anders als bei PRB-Luc zeigen beide Antiöstrogene keinen agonistischen Effekt über die verschiedenen ERs. Raloxifen reduziert die Aktivität sogar unter das Niveau des Ansatzes ohne Ligand. ER α Δ AF1 hat eine geringere Aktivität als der ER α WT-Rezeptor, daher darf angenommen werden, daß AF1 in dieser Zelllinie funktionell ist. Die Deletion der AF2-Domäne von ER α führt zu einem vollständigen Verlust der Östrogen-vermittelten Transaktivierung. ER α Δ AF2 reduziert die Reporter-gen-Aktivität sogar unter das Niveau des Ansatzes ohne Ligand. Die Transaktivierung durch ER β ist nahezu identisch mit der Transaktivierung durch ER α Δ AF1.

4.2.5 Bedeutung von AF1 und AF2 für die Regulation von PR_B

Es sollte gezeigt werden, ob die Regulation des PRB-Promotors durch ER α über die gleichen Transaktivierungsfunktionen erfolgt wie die Regulation von ERE2-TK-Luc.

Wir haben daher die Experimente mit PRB-Luc an Stelle von ERE2-Tk-Luc in der gleichen Zelllinie wiederholt (Ishikawa). Die Abbildung 4.2.5.1 zeigt die Transaktivierung des PRB-Promotors durch ER-Varianten in Ishikawa-Zellen.

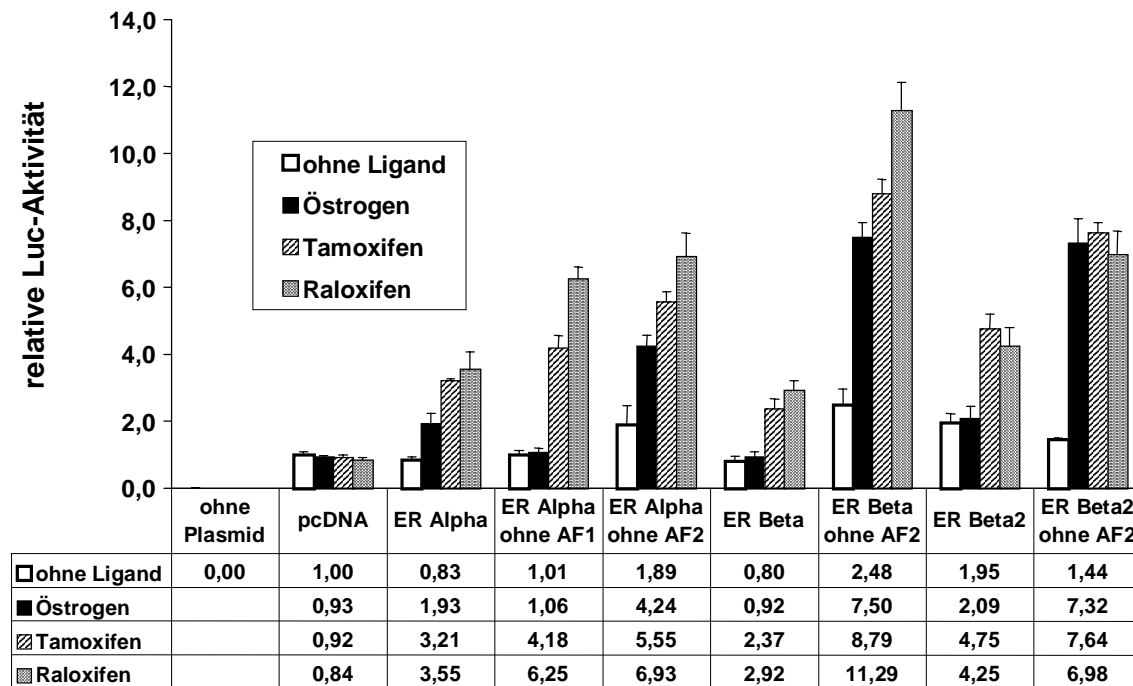


Abbildung 4.2.5.1: Regulation von PRB-Luc durch ER-Varianten in Ishikawa-Zellen.

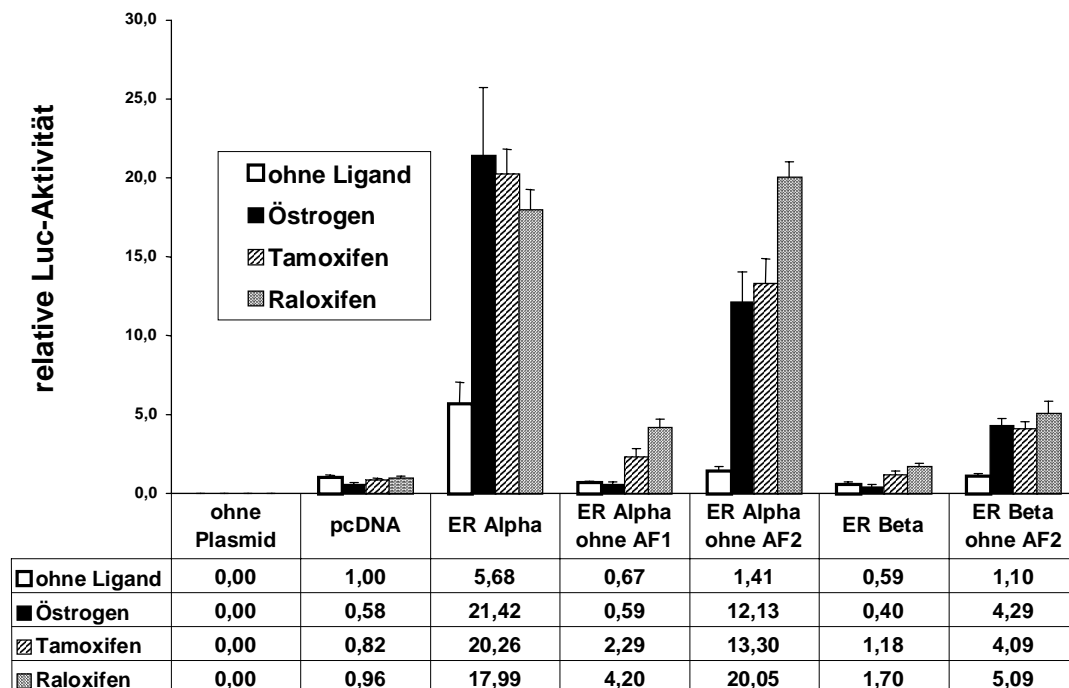
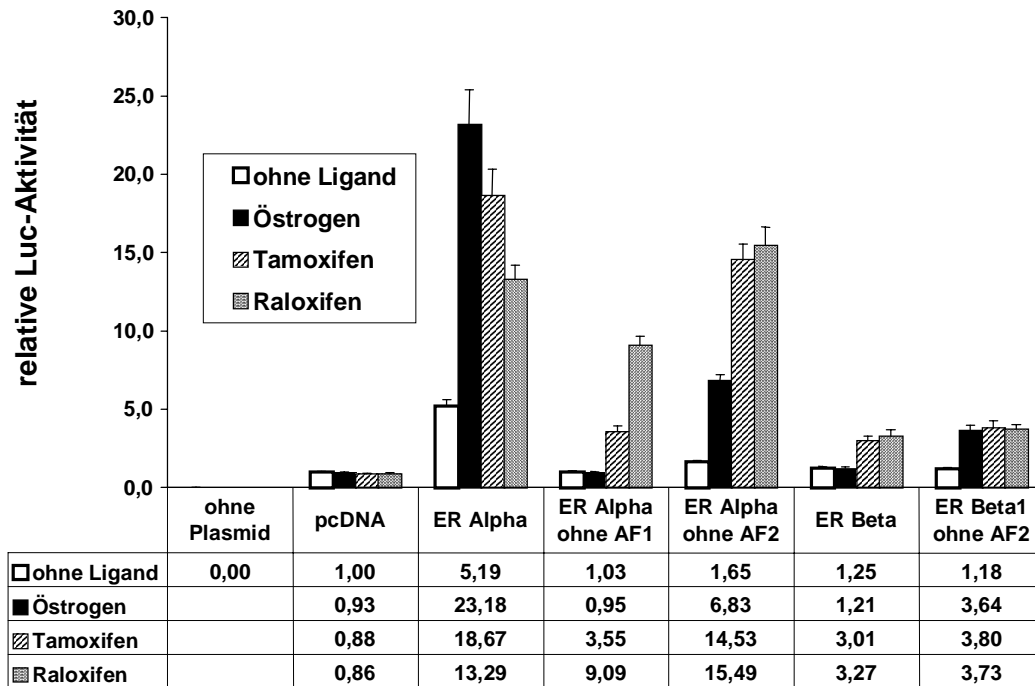
Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Indikatoren auf den Säulen zeigen die mittlere Standardabweichung aus allen drei Experimenten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne Ligand) ohne kotransfizierten ER gleich 1 gesetzt.

Wie erwartet aktivieren die beiden WT-Östrogenrezeptoren die Aktivität von PRB-Luc wie zuvor gezeigt (siehe oben). Anders als beim ERE2-TK Promotor führt die Entfernung der AF1-Domäne von ER α zu einem vollständigen Verlust der Östrogen-vermittelten Transaktivierung, während die Stimulation durch die Antiöstrogene leicht gesteigert ist. Zu unserer Überraschung führt die Deletion der AF2-Domäne von ER α nicht zu einem Verlust der durch Östrogen oder Antiöstrogene vermittelten Stimulation.

Anders als über ER β , kann Östrogen über ER $\beta\Delta$ AF2 die Aktivität des PRB-Promotors effektiv stimulieren. Außerdem ist die Aktivität von ER $\beta\Delta$ AF2 mit allen drei Liganden deutlich höher als die von ER β . Die Regulation durch ER β und ER β 2 sowie ER $\beta\Delta$ AF2 und ER β 2 Δ AF2 sind nahezu identisch.

Die Östrogen-abhängige Regulation von Promotoren, die kein ERE-Element enthalten, ist als Zelllinien-spezifisch beschrieben. Um zu zeigen, daß die AF2-unabhängige Regulation des PRB-Promotors nicht auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt ist, wurde das Experiment mit

Karzinomzelllinien aus verschiedenen Geweben wiederholt. Dazu wurden die Karzinomzelllinien HeLa (Zervix), Hey (Ovar) und BT20 (Brust), wie für Ishikawa-Zellen beschrieben, transfiziert. Die Abbildung 4.2.5.2 zeigt die Regulation des PRB-Promotors durch ER-Varianten in HeLa, Hey und BT20-Zellen.



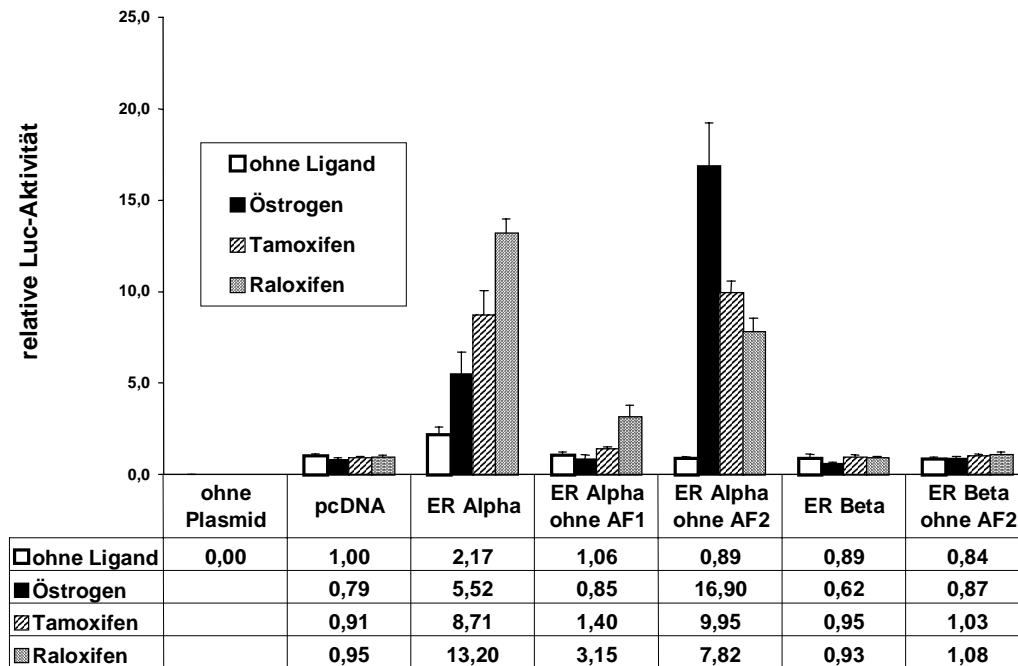


Abbildung 4.2.5.2: Regulation von PRB-Luc durch ER-Varianten in HeLa (oben), Hey (Mitte) und BT20-Zellen (unten).

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne Ligand) mit pcDNA gleich 1 gesetzt.

In allen drei Zelllinien ist die Stimulation durch ER α /E2 AF1-abhängig aber unabhängig von AF2. Bei BT20-Zellen führt die Deletion der AF2 von ER α sogar zu einer deutlichen Steigerung der Östrogen-vermittelte Stimulation von zweifach auf 18-fach.

Eine leichte Steigerung der Östrogen-Antwort nach AF2 Deletion lässt sich auch bei Ishikawa und Hey-Zellen, aber nicht bei HeLa-Zellen nachweisen. Wie bei Ishikawa-Zellen führt die Deletion der AF1 bei allen drei Zelllinien zu einer vollständigen Eliminierung der Stimulation durch Östrogen. Ebenso kann Östrogen den PRB-Promotor nicht über ER β stimulieren. Anders als bei Ishikawa-Zellen haben ER α Δ AF1 und ER β in diesen drei Zelllinien eine deutlich geringere Aktivität als ER α . In BT20-Zellen sind ER β und ER β Δ AF2 fast vollständig inaktiv (Vergleiche pcDNA).

4.2.6 Repression von PR $_B$ über AF2 in SK-BR-3-Zellen

Bei den Zelllinien Ishikawa (Endometrium), HeLa (Zervix), Hey (Ovar) und BT20 (Brust) kann Östrogen die Aktivität des PRB-Promotors über ER α stimulieren. In der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SK-BR-3 lässt sich eine solche Stimulation jedoch nicht nachweisen. Statt dessen reprimiert Östrogen in dieser Zelllinie den PRB-Promotor über ER α und ER β . Die Abbildung 4.2.6.1. zeigt die Repression des PRB-Promotors durch Östrogenrezeptoren in SK-BR-3-Zellen.

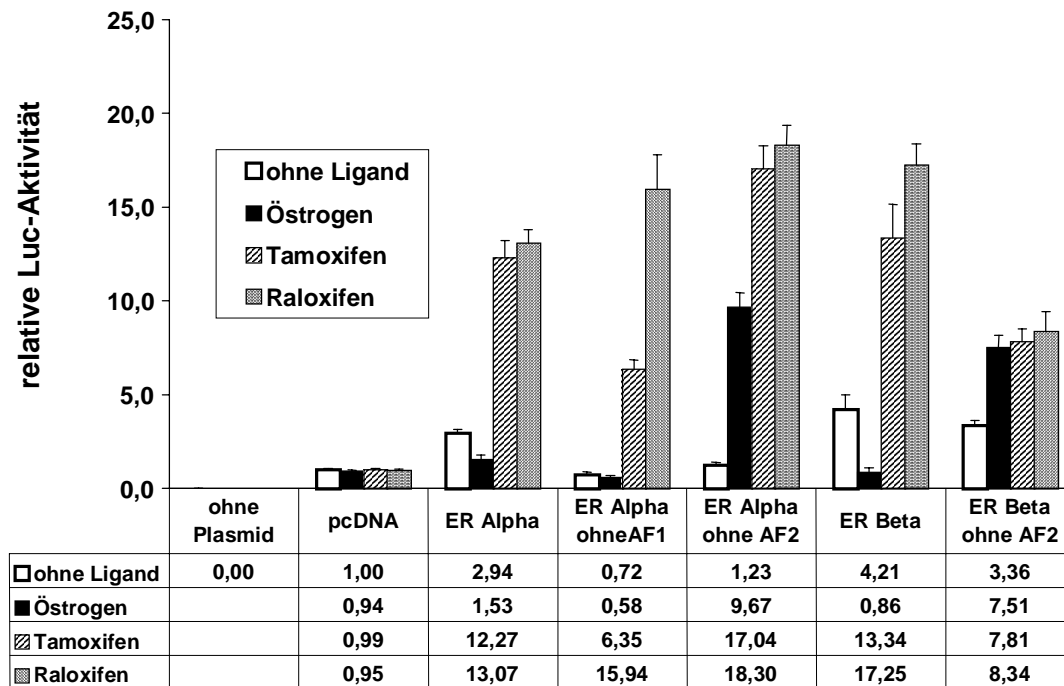


Abbildung 4.2.6.1: Östrogen reprimiert die Aktivität des PRB-Promotors über die AF2 von ER α und ER β .

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne Ligand) mit pcDNA gleich 1 gesetzt.

In dieser Zelllinie reprimiert Östrogen die Aktivität des PRB-Promotors über ER α auf ca. 50% und über ER β auf ca. 20 % der Basisaktivität (Aktivität des ER ohne Ligand). ER $\alpha\Delta$ AF2 und ER $\beta\Delta$ AF2 zeigen diese Repression nicht. Statt dessen können diese beiden Varianten, wie auch bei allen anderen Zelllinien gezeigt, die Aktivität des PRB-Promotors stimulieren, wenn Östrogen als Ligand verwendet wird (ER α ca. achtfach, ER β ca. zweifach). Wird ER $\alpha\Delta$ AF1 statt ER α kotransfiziert, so kommt es bei den Ansätzen ohne Ligand und mit Östrogen zu einer deutlichen Verringerung der Promotoraktivität. Wie bei allen anderen Zelllinien kann ER $\alpha\Delta$ AF1 die Aktivität des PRB-Promotors nicht stimulieren, wenn Östrogen als Ligand eingesetzt wird. Die Antiöstrogene können die Aktivität des Promotors über alle Rezeptor-Varianten stimulieren. Die Deletion von AF1 oder AF2 beeinflusst die Wirkung der Antiöstrogene nur geringfügig.

4.2.7 SRC-1 verstärkt die Repression in SK-BR-3-Zellen

Die bei SK-BR-3-Zellen beobachtete AF2-abhängige Repression des PRB-Promotors könnte unter anderem auf eine Titration von Kofaktoren zurückzuführen sein. Um zu untersuchen, ob dies auch beim PRB-Promotor der Fall ist, wurden Kotransfektionen mit steigenden Mengen an SRC-1

durchgeführt. Die Titration wurde mit ER β durchgeführt, da ER β , anders als ER α , SRC-1 nur über AF2 binden kann. Dabei wurden die gleichen Mengen an Reporterplasmid und ER β transfiziert. Zusätzlich wurden steigende Mengen an SRC-1 Expressionsplasmid transfiziert (pcDNA mit Maus SRC-1 0-50 ng, Karte siehe Anhang). Die an 100 ng fehlende Menge von SRC-1 wurde bei jedem Ansatz mit dem Expressionsplasmid pcDNA aufgefüllt. Insgesamt wurden 600 ng Plasmid (zuvor 500 ng) pro Well transfiziert. Darüber hinaus wurden die Transfektionsbedingungen nicht verändert. Die Abbildung 4.2.7.1 zeigt die Kotransfektion von ER β und SRC-1.

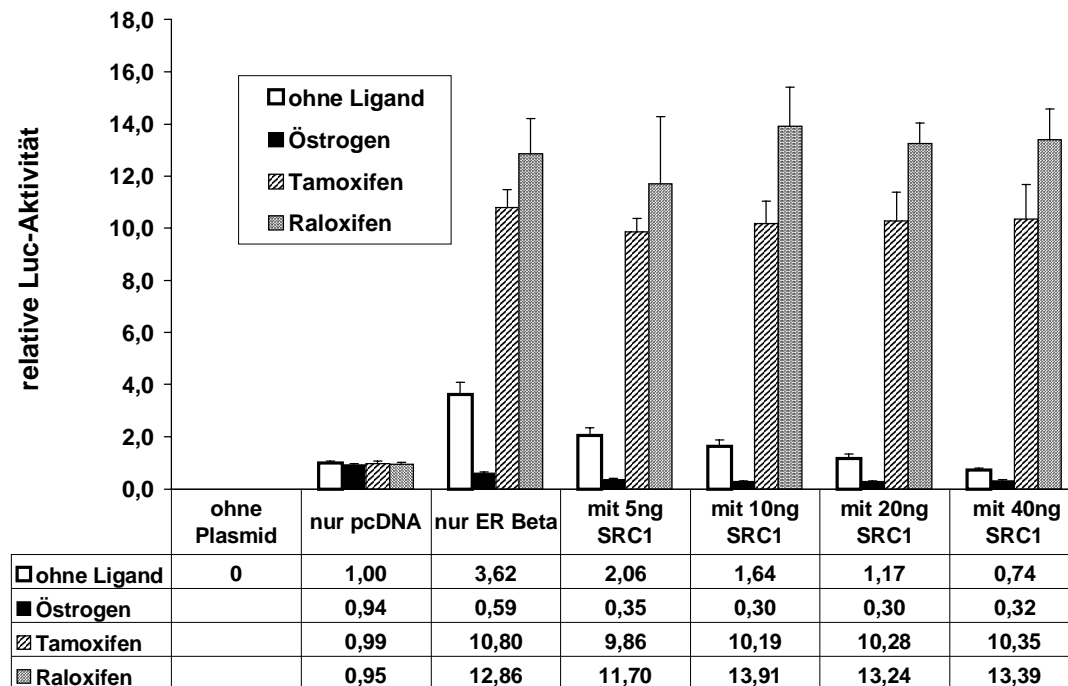


Abbildung 4.2.7.1: Die Östrogen-vermittelte Repression des PRB-Promotors kann in SK-BR-3-Zellen nicht durch eine Kotransfektion mit SRC-1 aufgehoben werden

Die einzelnen Säulen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der nicht stimulierte Ansatz (ohne Ligand) mit pcDNA gleich 1 gesetzt.

Wie zuvor gezeigt, kann ER β die Aktivität des PRB-Promotors unter das Niveau des Ansatzes ohne Ligand reprimieren, wenn Östrogen als Ligand eingesetzt wird, während die Antiöstrogene die Aktivität des PRB-Promotors stimulieren können. Die Östrogen-vermittelte Repression kann durch eine Kotransfektion von steigende Mengen an SRC-1 nicht aufgehoben werden. Vielmehr wird diese Repression bereits durch die Kotransfektion von 5 ng SRC-1-Expressionsplasmid verstärkt. Dieser Effekt kann durch die Transfektion von größeren Mengen SRC-1 nicht signifikant gesteigert werden. Außerdem kommt es mit steigenden Mengen SRC-1 zu einer deutlichen Verringerung der Promotoraktivität in den Ansätzen ohne Ligand. Die Wirkung der Antiöstrogenen auf PR β wird durch SRC-1 nicht beeinflusst.

5 Diskussion

5.1 Regulation von Promotoren mit AP-1 und ERE-Elementen

Die Östrogenrezeptoren ER α und ER β regulieren die Expression von Genen, die EREs (estrogen responsive elements) enthalten. Nach dem „klassischen“ Modell der Genregulation, bindet Östrogen im Zytoplasma an die Östrogenrezeptoren. Nach Translokalisierung in den Zellkern und Dimerisierung binden die Östrogenrezeptoren ER α und ER β an die ERE-Elemente in den Promotoren von Östrogen-regulierten Genen. Die Dimerisierung führt zur Bindung von Koaktivatoren wie SRC-1 und p300, die zur Transaktivierung beitragen (1.4). Beide Östrogenrezeptoren binden E2 mit der gleichen Affinität und zeigen ähnliche Effekte in der Regulation von Promotoren mit ERE-Elementen. Daher war zunächst unklar, warum zwei verschiedene Östrogenrezeptoren existieren. Mittlerweile konnten jedoch eine Reihe von Promotoren identifiziert werden, die einer differentiellen Regulation durch ER α und ER β unterliegen. Es konnte gezeigt werden, daß die Östrogenrezeptoren diese Promotoren über alternative cis-Elemente, wie z.B. AP-1- und SP1-Elemente, regulieren (Paech et al., 1997; Saville et al., 2000; Webb et al., 1999). Obwohl *in vitro* sowohl ER α als auch ER β mit SP1 interagieren können, kann nur ER α ein Sp-1 abhängiges Reporter-gen stimulieren. Ebenso können Promotoren mit AP-1-Elementen durch Östrogen nur über ER α stimuliert werden.

AP-1-Elemente sind Bindungsstellen für Dimere der Transkriptionfaktoren c-Fos und c-Jun, welche durch Tyrosinkinase aktiviert werden. Die Bedeutung der AP-1-Elemente für die Östrogen-abhängige Genregulation ist noch immer unklar. Aufgrund einer Reihe von Indizien wird jedoch angenommen, daß diese Art der Regulation ähnlich bedeutsam sein könnte wie die Regulation über ERE-Elemente. So korreliert die proliferative Wirkung der Antiöstrogene mit der Wirkung der ERs auf den AP-1-Komplex. Zum Beispiel stimuliert Tamoxifen die Expression von AP-1-regulierten Genen in Uterus-, aber nicht in Mammakarzinom-Zelllinien. Dementsprechend kann Tamoxifen die Proliferation von Uterus-Zellen, aber nicht von Mammakarzinom-Zellen stimulieren (Webb et al., 1995). Zudem kann Raloxifen in Uterus-Zellen weder die Expression von AP-1-regulierten Genen noch deren Proliferation stimulieren. Aufgrund dieser Parallelen wurde postuliert, daß Antiöstrogene ihre proliferativen Effekte - zumindest teilweise - über AP-1-Elemente ausüben (Paech et al., 1997).

Darüber hinaus kann Östrogen AP-1-regulierte Gene in einigen Mammakarzinom-Zelllinien stimulieren und in Anderen reprimieren. Die Genregulation über AP-1-Elemente bietet daher eine Erklärung für die Zelllinien-spezifische proliferative oder antiproliferative Wirkung des Östrogens, die mit einer Genregulation über ERE-Elemente nicht befriedigend erklärt werden kann.

Wie Östrogenrezeptoren Promotoren mit AP-1-Elementen regulieren ist bisher noch unklar. Die Regulation über diese Elemente scheint durch die Modifikation von Protein-Protein Interaktionen zu

erfolgen, ohne daß die ERs direkt an die Promotor-DNA binden (Jakacka et al., 2001). Da Steroidrezeptor-Koaktivatoren, wie z.B. SRC-1, in den AP-1-Komplex integriert sind, wurde postuliert, daß die ERs über diese Koaktivatoren an den AP-1-Komplex gebunden werden (Kamei et al., 1996; Torchia et al., 1997).

Wir haben kürzlich eine Splice-Variante von ER β , den sogenannten ER β 2 aus einer Ratten cDNA-Bibliothek kloniert. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) dieser Variante enthält ein zusätzliches Mini-Exon von 54 bp oder 18 Aminosäuren Länge (Hanstein et al., 1999). Bei Nagern wird ER β 2 in vielen Zelltypen höher exprimiert als ER β (Chu und Fuller, 1997; Petersen et al., 1998). So wird ER β 2 im Gehirn bis zu achtfach höher exprimiert. Daher wird angenommen, daß ER β 2 eine spezifische physiologische Funktion hat.

ER β 2 bindet Östradiol mit einer etwa 100-fach niedrigeren Affinität als ER β . Beide ER β -Varianten können ein ERE-reguliertes Reportergen stimulieren. In pull-down-Assays konnte eine Östrogen-induzierte Interaktion von SRC-1 mit der LBD von ER β aber nicht von ER β 2 nachgewiesen werden (Hanstein et al., 1999). Aufgrund der postulierten Bedeutung der SRC-1-Bindung für die Regulation über AP-1-Elemente, ist es denkbar, daß die beiden ER β -Varianten Promotoren mit AP-1-Elementen unterschiedlich regulieren. Ziel dieser Studie war der Vergleich der Transaktivierung eines AP-1-regulierten Gens durch ER α , ER β und ER β 2. Außerdem sollte die Bedeutung der Kofaktoren bei der Genregulation über AP-1-Elemente untersucht werden.

5.1.1 Regulation von ERE2-TK-Luc und pAP-1-Luc

Zunächst wurde die Genregulation über ERE-Elemente in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3 untersucht. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie als ER-negativ beschrieben ist. Wir konnten jedoch eine ER α -Expression an der Nachweisgrenze zeigen (Abbildung 4.1.1.1). Der endogene ER scheint jedoch das ER-Reporterplasmid nicht zu stimulieren. Möglicherweise ist die ER-Expression zu niedrig, um das Reporterplasmid zu aktivieren. Ebenso ist es denkbar, daß in dieser Zelllinie eine der vielen bekannten, nicht funktionellen Splice-Varianten von ER α exprimiert wird. Für unsere Experimente ist vorrangig von Bedeutung, daß der endogene ER keinen Einfluß auf ERE2-TK-Luc hat (Abbildung 4.1.2.2.).

Wie in den meisten anderen Zelllinien, kann ER α /E2 den ERE-Promotor in SK-BR-3-Zellen effektiver stimulieren als ER β /E2. Es wird angenommen, daß ER α aktiver ist, da dieser - anders als ER β - eine starke AF1-Aktivität besitzt (Cowley und Parker, 1999). ER β 2/E2 kann ERE2-TK-Luc weniger effektiv stimulieren als ER β . Dies ist vermutlich auf die schlechtere Koaktivator-Bindung durch ER β 2 zurückzuführen. Eine vergleichbare Regulation von ERE2-TK-Luc durch ER α , ER β und

ER β 2 wurde für U2-OS-Zellen gezeigt (Hanstein et al., 1999). Daher wurde hier auf eine Wiederholung des Experiments in dieser Zelllinie verzichtet.

Die Regulation von pAP-1-Luc in SK-BR-3-Zellen zeigt deutliche Unterschiede zur Regulation von ERE2-TK-Luc in der gleichen Zelllinie. Bei pAP-1-Luc können die ERs die Aktivität des AP1-Reporters Ligand-unabhängig stark steigern (Abbildung 4.1.3.1). Eine solche Ligand-unabhängige Stimulation ist bereits zuvor beschrieben worden und ist auch bei anderen Steroidrezeptoren weit verbreitet (Weigel und Zhang, 1998). Zum Beispiel kann EGF die Basisaktivität (Aktivität ohne Ligand) von ER α steigern, indem es die Phosphorylierung des N-Terminus (Serin 118) fördert (Kato et al., 1995). Die Erhöhung der ER α -Basisaktivität durch Insulin ist hingegen nur von der Phosphorylierung der C-terminalen AF2-abhängig (Patrone et al., 1996). Daher wird angenommen, daß es verschiedene Wege der Ligand-unabhängigen Aktivierung von ER α gibt. Zur Zeit ist noch unklar wie die Östrogenrezeptoren die Promotoraktivität Ligand-unabhängig regulieren können. Möglicherweise kann der Östrogenrezeptor, nach Phosphorylierung, Kofaktoren Ligand-unabhängig binden. Entsprechende Kofaktoren sind aber noch nicht identifiziert worden.

Im Gegensatz zu dem Reporterplasmid ERE2-TK-Luc wird das Reporterplasmid pAP-1-Luc in SK-BR-3-Zellen nur durch ER β 2 Östrogen-abhängig stimuliert. Durch ER α und insbesondere ER β wird die Promotoraktivität reduziert. Andere Autoren konnten, in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie, Repression oder Stimulation des AP-1-Promotors durch ER α beobachten (Webb et al., 1995). Hingegen kann ER β /E2 den AP-1-Komplex grundsätzlich nicht stimulieren. Die folgenden Abschnitte werden mögliche Gründe aufzeigen, warum ER α /E2 den AP-1-Promotor in den von uns untersuchten Zelllinien (und anderen) nicht stimulieren kann.

Antiöstrogene, wie Raloxifen und Tamoxifen wirken gewebespezifisch (Jordan, 1998). Zum Beispiel wirkt Raloxifen in der Brust antiproliferativ, aber im Knochen proliferativ. Einige Autoren vertreten die Auffassung, daß diese gewebespezifischen Effekte über AP-1-Elemente vermittelt werden (Paech et al., 1997). In unseren Experimenten können die Antiöstrogene die Promotoraktivität in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3 über keinen der drei Rezeptoren stimulieren. In der Osteosarkom-Zelllinie U2-OS können die beiden SERMs den AP-1-Promotor über ER β stark stimulieren. Unser vereinfachtes Modell zeigt damit (für ER β) die gleiche Zelltyp- bzw. Gewebespezifität, die für die Antiöstrogene auch *in vivo* beschrieben sind. Die folgenden Abschnitte werden zeigen, daß die Rezeptor- und Zelllinien-spezifische Wirkung der Antiöstrogene durch die differentielle Expression von Kofaktoren erklärt werden kann.

5.1.2 Transaktivierung durch VP-16-Varianten

Die Repression durch ER β /E2 kann theoretisch auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen:

Zum einen ist es denkbar, daß die Östrogenrezeptoren über SRC-1 an den AP-1-Komplex binden und dessen Aktivität reprimieren. Dabei ist allerdings unklar, wie die ERs die Aktivität des AP-1-Komplexes modifizieren.

Zum anderen ist es denkbar, daß die ERs nicht an den AP-1-Komplex gebunden werden. In diesem Fall müßten die ERs die Aktivität des AP-1-Komplexes reduzieren, z.B. indem sie dem AP-1-Komplex Koaktivatoren entziehen. Es sollte gezeigt werden, ob die ERs in den AP-1-Komplex integriert werden. Dazu wurden Östrogenrezeptoren mit einer zusätzlichen Transaktivierungsfunktion konstruiert (Abbildung 4.1.5.1). Die zusätzliche virale Transaktivierungsfunktion (VP-16) kann die Transkriptionsrate erheblich steigern, wenn diese direkt mit dem Transkriptionskomplex am Promotor interagieren kann. Die VP-16-Transaktivierungsfunktion kann daher als Indikator für die Promotor-Bindung verwendet werden. Falls die Östrogenrezeptoren direkt an den Promotor binden, sollten die VP-16-ERs deutlich stärkere Transkriptionsfaktoren sein als die WT-ERs.

Um die Funktionalität der VP-16-Varianten zu überprüfen, wurden diese zunächst bezüglich der Regulation von ERE2-TK-Luc untersucht (Abbildung 4.1.5.2 oben, vergleiche Abbildung 4.1.2.2). Da Promotoren mit ERE-Elementen direkt durch die ERs gebunden werden, ist zu erwarten, daß die VP-16-Varianten diesen Promotor sehr effektiv stimulieren. Tatsächlich können die VP-16 ERs den ERE-Reporter viel effektiver stimulieren als die korrespondierenden WT-Rezeptoren. Das VP-16-Protein allein kann den Promotor nicht stimulieren. Daher ist anzunehmen, daß das VP-16-Protein über die DNA-Bindungs-Domäne der ERs in den Transkriptionskomplex integriert wird.

Antiöstrogene wie Tamoxifen und Raloxifen können die DNA-Bindung durch ER α und ER β stimulieren, blockieren aber deren Aktivierungsfunktionen (Brzozowski et al., 1997). Daher können Tamoxifen und Raloxifen den ERE-Promotor nicht über die WT-Rezeptoren stimulieren. Die VP-16 Transaktivierungsfunktion ist allerdings Ligand-unabhängig. Daher können die VP-16 ERs, anders als die WT-ERs, den ERE-Promotor auch mit Antiöstrogenen stimulieren, da diese die Bindung der ERs an das ERE-Element induzieren können.

Der AP-1-Promotor wird durch die VP-16-Östrogenrezeptoren nicht effektiver stimuliert als durch die WT-Rezeptoren. Vielmehr sind die VP-16 ERs deutlich ineffektiver (Abbildung 4.1.5.2 unten). Vermutlich entzieht die VP-16-Domäne dem AP-1-Komplex Transkriptionsfaktoren und reduziert damit dessen Promotoraktivität. Tatsächlich kann auch das separat exprimierte VP-16-Protein die Promotoraktivität leicht reprimieren.

Unsere Daten lassen daher darauf schließen, daß die ERs (in SK-BR-3-Zellen) nicht direkt an den AP-1-Komplex binden. Möglicherweise regeln die ERs die Aktivität des AP-1-Komplexes, indem sie diesem Koaktivatoren oder Korepressoren entziehen.

Warum ER α in SK-BR-3-Zellen nicht an den AP-1-Komplex binden kann, ist noch unklar. Vermutlich bindet ER α in manchen Zelllinien den AP-1-Komplex über Transkriptionsfaktoren, die in SK-BR-3-Zellen nicht (oder zu niedrig) exprimiert werden. Möglicherweise ist die Bindung des AP-1-Komplexes durch ER α eine notwendige Voraussetzung für eine Stimulation durch die ERs, da nur auf diese Weise die Aktivierungsfunktionen von ER α in den AP-1-Komplex integriert werden können.

5.1.3 Bedeutung der ER-Aktivierungsfunktionen für die Regulation von pAP-1-Luc

Die Bedeutung der Transaktivierungsfunktionen bei der Regulation von pAP-1-Luc sollte aufgeklärt werden. Dazu wurde die Regulation von pAP-1-Luc durch ER-Varianten mit Deletionen der Aktivierungsfunktionen AF1 (ER α) und AF2 (ER α , ER β und ER β 2) in SK-BR-3-Zellen untersucht. Mit Östrogen kann eine ER α -Variante ohne AF1 (ER α Δ AF1) den AP1-Promotor ebenso effektiv reprimieren wie ER α . Die ER α -Variante ohne AF2 (ER α Δ AF2) kann den AP-1-Promotor hingegen nicht reprimieren. Diese Daten zeigen, daß die Östrogen-abhängige Repression der Promotoraktivität durch AF2 vermittelt wird. Bei Zelllinien in denen der AP-1-Komplex durch ER α stimuliert wird erfolgt die Stimulation ebenfalls über AF2 (Webb et al., 1995). Die Regulation von Promotoren mit AP-1-Elemente durch ER α scheint also in jedem Fall AF2-abhängig zu sein, unabhängig ob ER α den Promotor reprimiert oder stimuliert. Möglicherweise reprimiert ER α den AP-1-Promotor in SK-BR-3-Zellen, indem er diesem Koaktivatoren entzieht. Dafür spricht vor allem, daß ER α den AP-1-Promotor in dieser Zelllinie vermutlich nicht direkt binden kann (s.o.).

Die Repression der Promotoraktivität durch Antiöstrogene ist von AF1 und AF2-abhängig. Durch die Deletion von AF1 kommt es zu einer Aufhebung der Repression durch Raloxifen, die Deletion von AF2 führt zur Aufhebung der Repression durch beide Antiöstrogene. Vergleichbare Experimente sind bereits zuvor durchgeführt worden (Webb et al., 1995). Dabei zeigte sich (wie bei unseren Experimenten), daß ER α den AP-1-Komplex in den meisten Zelllinien nur dann mit Antiöstrogenen stimulieren kann, wenn die AF1 von ER α deletiert wird. Es wurde vorgeschlagen, daß die Antiöstrogen-vermittelte Stimulation durch ER α durch die Titration von Korepressoren erfolgt. Tatsächlich scheint ER α nach Antiöstrogen-Bindung vorrangig Korepressoren zu binden. So induziert Tamoxifen die Bindung der Korepressoren SMRT und NcoR (Lavinsky et al., 1998), aber inhibiert die Bindung von p160-Koaktivatoren (Halachmi et al., 1994). Für die Bindung von Korepressoren ist dabei, anders als für die Bindung von Koaktivatoren, AF2 nicht erforderlich. Dementsprechend ist die Stimulation durch Antiöstrogen AF2 unabhängig (Abbildung 4.1.6.1). Wie AF1 und AF2 die Stimulation durch Antiöstrogene blockieren ist zur Zeit noch unklar. Möglicherweise werden über die beiden Aktivierungsfunktionen Kofaktoren gebunden, welche die Bindung der Korepressoren inhibieren.

Die Deletion der AF2-Domäne von ER β und ER β 2 zeigt hingegen keinen klaren Effekt. Lediglich die Basisaktivität ist bei beiden Varianten deutlich reduziert. Die folgenden Experimente mit SRC-1 deuten aber darauf hin, daß die Östrogen-vermittelte Repression durch ER β - zumindest zum Teil - durch AF2 vermittelt wird.

5.1.4 Bedeutung von SRC-1 für die Regulation von pAP-1-Luc

Wir wollten im Folgenden untersuchen, warum Östrogen die Aktivität des AP-1 Reporters in SK-BR-3-Zellen über ER β reprimiert, aber über ER β 2 stimuliert. ER β und ER β 2 unterscheiden sich in ihrer Affinität zu p160-Koaktivatoren wie z.B. SRC-1 (Hanstein et al., 1999). Die Bindung von p160-Koaktivatoren ist essentiell für die Transaktivierung von Promotoren, die ERE-Elemente enthalten (Halachmi et al., 1994). Außerdem ist SRC-1 ein Bestandteil des AP-1-Komplexes. Es wurde daher postuliert, daß die p160-Koaktivatoren auch bei der Regulation von Promotoren mit AP-1-Elementen eine wichtige Rolle spielen (Webb et al., 1999). Möglicherweise konkurrieren ER α und ER β mit dem AP-1-Komplex um eine begrenzte Menge an SRC-1 und reduzieren damit dessen Aktivität. Falls dies der Fall ist, sollte sich die Repression durch eine Überexpression von SRC-1 aufheben lassen. Wir wollten daher prüfen, ob die Aktivität der verschiedenen ERs durch Kotransfektion mit SRC-1 modifiziert wird. Dazu wurden die Experimente in SK-BR-3-Zellen wiederholt, wobei zusätzlich zwischen 0 und 80 ng SRC-1-Expressionsplasmid kotransfiziert wurden (Abbildung 4.1.7.1).

Durch die Kotransfektion mit SRC-1 kann die Stimulation durch ER β 2/E2 unterdrückt werden. Außerdem kann SRC-1 die Repression durch ER β /E2 verstärken. Damit ist auszuschließen, daß die Repression der AP-1-Aktivität, in SK-BR-3-Zellen, durch eine Titration von SRC-1 verursacht wird. Vielmehr wirkt SRC-1 über die ER β -Varianten als Korepressor der Promotoraktivität. Vermutlich kann ER β 2 die Aktivität von pAP-1-Luc nicht reprimieren, da dessen Affinität zu SRC-1 zu niedrig ist. Allerdings kann SRC-1 auch die Aktivität von ER β 2 beeinflussen. Daher muß angenommen werden, daß ER β 2 eine geringe Affinität zu SRC-1 hat. Tatsächlich kann durch eine Überexpression von SRC-1 die Transaktivierung von ERE2-TK-Luc durch ER β 2 verbessert werden (Hanstein, persönliche Mitteilung). Vermutlich führen die zusätzlichen 18 Aminosäuren in der LBD von ER β 2 zu Veränderungen in der Rezeptorstruktur, welche die Bindung von SRC-1 erschweren. Warum ER β 2 den AP-1-Promotor stimulieren kann ist aber noch unklar. Möglicherweise bindet ER β 2 statt Koaktivatoren vorzugsweise Korepressoren.

Die Regulation des AP-1-Promotors durch ER α wird durch SRC-1 hingegen nicht beeinflusst (Abbildung 4.1.7.1 unten). SRC-1 muß daher, bezüglich der Regulation des AP-1-Komplexes, (zumindest in dieser Zelllinie), als Rezeptor-spezifischer Korepressor von ER β angesehen werden.

Dieser Befund ist überraschend, da SRC-1 bei der Regulation über ERE-Elemente sowohl Koaktivator von ER α als auch von ER β ist.

5.1.5 Bedeutung von CBP für die Regulation von pAP-1-Luc

Die Regulation des AP-1-Promotors durch Antiöstrogene wird bei keinem der drei ERs durch SRC-1 verändert (Abbildung 4.1.7.1). Dieser Befund war zu erwarten, da Antiöstrogene die Bindung von SRC-1 (und anderen p160 Koaktivatoren) blockieren (Halachmi et al., 1994). Die Repression durch Antiöstrogene muß daher über andere Koaktivatoren vermittelt werden. Potentielle Kandidaten für diese Art der Regulation sind die p300-Koaktivatoren, zu denen die Proteine p300 und CBP gehören (1.4.2). CBP ist Bestandteil des AP-1-Komplexes und wird durch Steroidrezeptoren über AF1 und AF2 gebunden (Hanstein et al., 1996). Außerdem bindet CBP ER-Koaktivatoren wie z.B. SRC-1. Es wurde vorgeschlagen, daß die Östrogenrezeptoren über CBP-SRC-1 in den AP-1-Komplex integriert werden (Webb et al., 1999). Wir haben daher die Wirkung von CBP auf die Regulation des pAP-1-Luc-Promotors durch die Östrogenrezeptoren untersucht. Dazu wurden die Experimente in SK-BR-3-Zellen wiederholt, wobei steigende Mengen an CBP-Expressionsplasmid kotransfiziert wurden (0-200 ng).

Anders als SRC-1 kann CBP die Transaktivierung durch ER β 2/E2 nicht reprimieren (Abbildung 4.1.8.1, oben). Statt dessen wird durch die Kotransfektion von CBP die Aktivität von ER β 2 verstärkt. Dabei kommt es aber lediglich zu einer quantitativen Veränderung der ER β 2-Wirkung auf den AP-1-Promotor. Qualitativ wird die Regulation nicht modifiziert.

Die Kotransfektion von CBP mit ER β führt zur Aufhebung der Repression durch Tamoxifen und Raloxifen (Abbildung 4.1.8.1, Mitte). Bei der höchsten CBP-Konzentration ist sogar eine schwache Stimulation feststellbar. Vermutlich wird die Antiöstrogen-vermittelte Repression durch ER β in SK-BR-3-Zellen durch eine Titration von p300-Koaktivatoren wie z.B. CBP vermittelt.

Dieses Experiment demonstriert, daß die Zelllinien-spezifische Wirkung der Antiöstrogene ein Resultat der differentiellen Expression von Kofaktoren (wie z.B. CBP) sein kann. Möglicherweise werden Koaktivatoren wie CBP in U2-OS-Zellen höher exprimiert als in SK-BR-3-Zellen, so daß ER β mit TAM oder RLX den AP-1-Promotor in SK-BR-3-Zellen reprimiert und in U2-OS-Zellen stimuliert.

Auf ER α zeigt CBP keinen signifikanten Effekt (Abbildung 4.1.8.1, unten). Selbst bei 200 ng CBP kommt es nicht zu einer Aufhebung der Antiöstrogen-vermittelten Repression. Ebenso kann ER α den AP-1-Promotor nicht in U2-OS-Zellen stimulieren. Andere Autoren haben die Regulation eines AP-1-regulierten Promotors in weiteren Zelllinien untersucht. Entsprechend unseren Ergebnissen konnten dabei die Antiöstrogene den AP-1-Promotor nur über ER β stimulieren. Die Autoren konnten

nachweisen, daß die AF1-Domäne von ER α (Regionen A und B) eine Antiöstrogen-vermittelte Stimulation verhindert. Nach Entfernung der AF1-Domäne reguliert ER α den AP-1-Promotor genauso wie ER β . Es ist daher nicht überraschend, daß der AP-1-Promotor auch in unseren Experimenten nicht durch den WT-ER α stimuliert werden kann.

5.1.6 ER β 2 kommt beim Menschen nicht vor

Obwohl ER β 2 bei Nagern hoch exprimiert wird (Chu und Fuller, 1997; Lu et al., 1998; Maruyama et al., 1998; Petersen et al., 1998), konnten wir ER β 2 in humanen Tumoren nicht nachweisen (Abbildung 4.1.9.1). Dieser Befund wurde bereits mehrfach von anderen Autoren bestätigt (Lu et al., 1998; Moore et al., 1998). Bei Durchführung der RT-PCR zur Identifikation von ER β 2 war die genomische Sequenz von ER β noch nicht bekannt. Mittlerweile ist diese jedoch veröffentlicht worden. Daher kann das zusätzliche ER β 2-Exon (54 bp) durch Sequenzvergleich mit dem Intron zwischen Exon 5 und 6 von ER β gesucht werden. Das 7546 bp große Intron enthält eine 47 bp lange Sequenz, die Homologie zu ER β 2 aufweist.

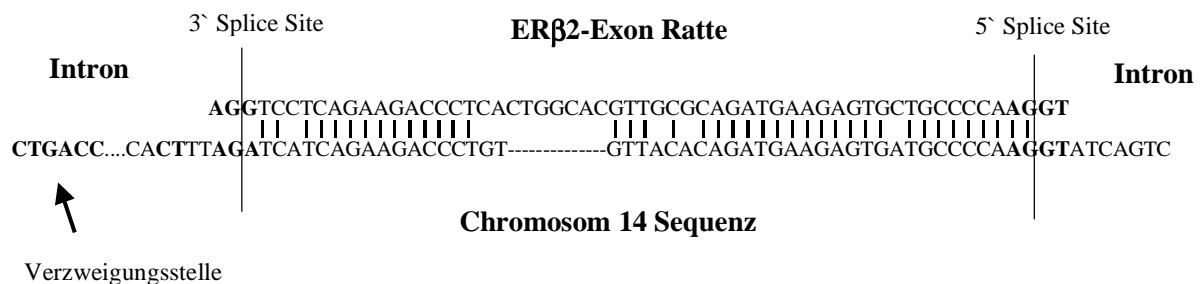


Abbildung 5.1.6.1: Putatives ER β 2-Exon in der genomischen Sequenz von ER β

Die Splice-Konsensus-Sequenzen, sowie die Verzweigungsstelle sind durch Fettdruck hervorgehoben. Striche bedeuten Lücken in der Sequenz, Punkte stehen für eine nicht näher definierte Sequenz. Die senkrechten Linien kennzeichnen die Splice-Stellen (NCBI-Sequenz: AL161756).

Diese Sequenz ist von Splice-Konsensussequenzen eingerahmt. Außerdem findet sich im Intron ca. 500 bp vor dieser Sequenz eine voll konservierte Verzweigungsstelle. Da das putative Exon 47 bp groß ist, würde es durch die Integration dieses Exons zu einer Verschiebung des Leserasters kommen. Der resultierende Östrogenrezeptor hätte daher keine Ligandenbindungsdomäne. Daher ist auszuschließen, daß in humanen Zellen eine funktionelle ER β 2-Variante exprimiert wird. Es ist noch unklar, warum ER β 2 bei Nagern hoch exprimiert wird. Da ER β 2 bei Ratten in vielen Geweben höher exprimiert wird als ER β , wurde für diese Varianten eine physiologische Funktion postuliert. Unsere Experimente lassen zudem auf eine differentielle Genregulation durch ER β 2 über AP-1-Element schließen. Es ist daher überraschend, daß ER β 2 in humanem Gewebe nicht exprimiert wird.

Spezies-spezifisches alternatives Splicing von Steroidrezeptoren ist allerdings schon zuvor dokumentiert worden. So wird z.B. der vermutlich funktionell bedeutsame Glukokortikoid-Rezeptor- β nur beim Menschen, aber nicht bei Nagern exprimiert (Oakley et al., 1996; Otto et al., 1997). Möglicherweise hat ER β 2 bei Nagern eine Spezies-spezifische Funktion oder die Funktion von ER β 2 wird beim Menschen durch andere Rezeptor-Varianten vermittelt.

5.1.7 Modell der Östrogen-vermittelten Regulation von AP-1-Elementen

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Regulation von AP-1-Promotoren durch Östrogen können zu einem hypothetischen Modell zusammengefaßt werden (Abbildung 5.1.7.1).

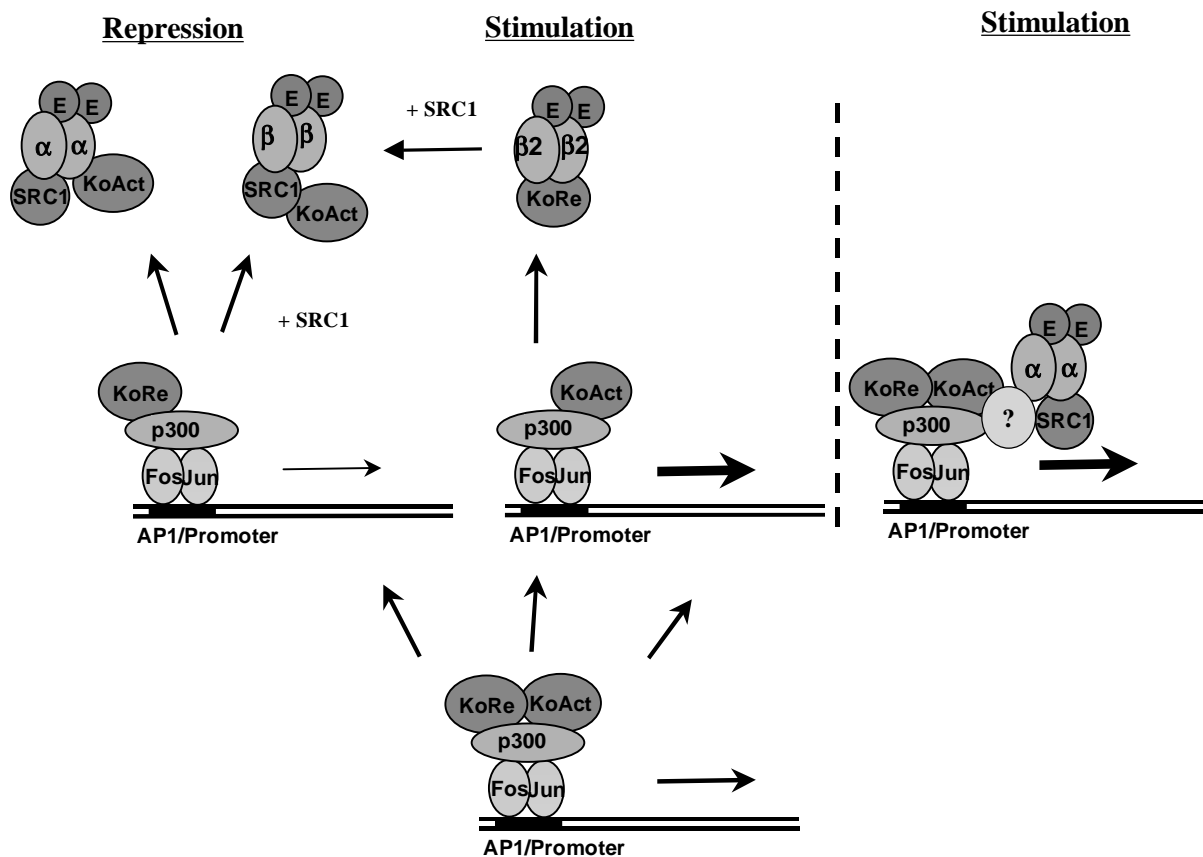


Abbildung 5.1.7.1: Modell der Regulation eines Promotors mit AP-1-Elementen durch ER α , ER β und ER β 2.

Abkürzungen: KoRe = Korepressor; KoAct = Koaktivator; ? = Integrator(en) von ER α

Das Jun/Fos-Heterodimer stimuliert die Transkription durch Rekrutierung von CBP/p300 und den damit assoziierten Proteinen, zu denen sowohl Korepressoren als auch Koaktivatoren gehören (Goldman et al., 1997)(Abbildung 5.1.7.1, unten). Unsere Experimente mit den VP-16-Varianten deuten darauf hin, daß der AP-1-Komplex (im Gegensatz zum ERE) in SK-BR-3-Zellen durch keinen der drei ERs gebunden wird (4.1.5)(Abbildung 5.1.7.1, links). Die Regulation muß daher auf

indirektem Wege erfolgen. Vermutlich erfolgt die Regulation durch die Bindung von Kofaktoren, welche dem AP-1-Komplex entzogen werden. Demnach können sowohl ER α als auch ER β den AP-1-Promotor reprimieren, indem sie dem AP-1-Komplex Koaktivatoren entziehen. Sowohl bei ER α als auch bei ER β werden diese Koaktivatoren über die AF2-gebunden (4.1.6). Bei ER β , aber nicht ER α , wird die Repression durch SRC-1 gefördert (4.1.7). ER β 2 kann den AP-1-Promotor vermutlich aufgrund seiner reduzierten Affinität zu SRC-1 nicht reprimieren.

Wie ER β 2 die Promotoraktivität von pAP-1-Luc stimuliert, ist noch zu klären. Vermutlich bindet ER β 2/E2 statt p160-Koaktivatoren vorrangig Korepressoren. Diese dürften dem AP-1-Komplex entzogen werden, wodurch die Promotoraktivität erhöht wird. Die an ER β 2 gebundenen Korepressoren können wahrscheinlich durch SRC-1 titriert werden, was zu einer Aufhebung der ER β -Stimulation bei hohen SRC-1-Konzentrationen führt. Mit diesem Modell kann auch erklärt werden, warum ER β 2/E2 den AP-1-Promotor nur in SK-BR-3, aber nicht in U2-OS-Zellen stimulieren kann. Möglicherweise ist in U2-OS-Zellen die Expression von p-160 Koaktivatoren höher und/oder die Expression von Korepressoren niedriger.

Von anderen Arbeitsgruppen durchgeführte Experimente mit VP-16-Varianten, lassen darauf schließen, daß ER α in manchen Zelllinien direkt an den AP-1-Komplex binden kann (Webb et al., 1995). Es wurde postuliert, daß ER α in diesem Fall die Aktivität des AP-1-Promotors stimuliert, indem er seine Aktivierungsfunktionen in den AP-1-Komplex integriert (Abbildung 5.1.7.1, rechts). Die Autoren sind der Auffassung, daß ER α seine Aktivierungsfunktionen über die an CBP gebundenen p160-Koaktivatoren in den AP-1-Komplex integriert. Dafür spricht vor allem, daß sowohl die p160-Bindung als auch die Stimulation des AP-1-Promotors von der AF2-Domäne abhängig sind. Zudem wird die Stimulation in diesen Zellen durch p160-Koaktivatoren gefördert. Außerdem bewirken Antiöstrogene, welche die p160-Bindung verhindern, keine Bindung von ER α an den AP-1-Komplex (Webb et al., 1995).

Allerdings können sowohl ER α als auch ER β p160-Koaktivatoren binden. Daher kann dieses Modell nicht erklären, warum ER β /E2 den AP-1-Promotor grundsätzlich nicht Östrogen-abhängig stimulieren kann. Unsere Experimente deuten darauf hin, daß SRC-1 alleine nicht ausreicht, um ER α in den AP-1-Komplex zu integrieren. So führt eine Überexpression von SRC-1 nicht zu einer Östrogen-abhängigen Stimulation durch ER α . Ebenso führt die Kotransfektion von Fos/Jun bzw. CBP nicht zu einer Östrogen-induzierten Stimulation durch ER α . Daher muß angenommen werden, daß für die Integration von ER α in den AP-1-Komplex mindestens ein weiterer noch unbekannter „Kointegrator“ erforderlich ist. Vermutlich wird dieser, bei Zelllinien in denen ER α repressiv wirkt, nicht (oder in unzureichender Menge) exprimiert, so daß ER α nicht an den AP-1-Komplex binden kann. Die gewebespezifische Expression dieses Kointegrators kann möglicherweise erklären, warum Östrogen die Expression einzelner Gene gewebespezifisch reprimieren oder stimulieren kann. Falls dieser

Kointegrator ER α -spezifisch ist, kann dies erklären, warum ER β den AP-1-Promotor grundsätzlich nicht stimulieren kann. Die Identifikation von Faktoren, die eine Integration von ER α in den AP-1-Komplex vermitteln, dürfte für das Verständnis der Genregulation über AP-1-Elemente essentiell sein.

5.1.8 Modell der Antiöstrogen-vermittelten Regulation von AP-1-Elementen

Die Östrogen-abhängige Stimulation durch AF2 erfolgt bei ERE-Promotoren durch die Rekrutierung von p160-Koaktivatoren (Halachmi et al., 1994). Diese werden durch eine hydrophobe Spalte, die aus den Helices 3,4,5 und 12 gebildet wird, an die LBD gebunden (Shiau et al., 1998).

Die Bindung von Tamoxifen an die LBD führt zu einer Rotation von Helix 12, welche die Bindung von p160-Koaktivatoren verhindert (Brzozowski et al., 1997). In dieser Konformation kann ER α allerdings Korepressoren wie SMRT und NCoR binden (Lavinsky et al., 1998). Daher wirken Antiöstrogene über AF2 reprimierend auf die Aktivität von ERE-Promotoren. Die AF1 von ER α ist allerdings Ligand-unabhängig und kann die Transkription daher auch nach SERM-Bindung stimulieren. Der Umfang der Stimulation variiert dabei jedoch in Abhängigkeit vom untersuchten Promotor und der verwendeten Zelllinie. Während Minimalpromotoren nicht durch ER α /SERMs stimuliert werden, zeigen komplexe Promotoren oft eine starke Antiöstrogen-vermittelte Stimulation (Watanabe et al., 1997). Da ER β keine funktionelle AF1 hat (Delaunay et al., 2000), kann ER β /SERMs Promotoren mit ERE-Elementen grundsätzlich nicht stimulieren (Watanabe et al., 1997). Es ist daher überraschend, daß Tamoxifen Promotoren mit AP-1-Elementen in U2-OS-Zellen nur über ER β stimulieren kann (4.1.4). Andere Arbeitsgruppen konnten eine ER β spezifische Stimulation durch Antiöstrogen bei weiteren Zelllinien nachweisen (Paech et al., 1997; Webb et al., 1999). Es ist denkbar, daß die Stimulation des AP-1-Komplexes über die MAP-Kinase Signaltransduktionskaskade erfolgt. In den von Webb et al. untersuchten Zelllinien konnten aber weder Antiöstrogene noch Östrogene die MAP- oder JNK-Kinasen über ER α oder ER β stimulieren. Es wurde daher vorgeschlagen, daß ER β den Promotor stimuliert, indem er diesem Korepressoren wie SMRT und NCoR entzieht (Webb et al., 1999). Dieses Modell setzt voraus, daß die Östrogenrezeptoren nach Tamoxifen-Bindung nicht direkt an den AP-1-Komplex binden können. Unsere Experimente mit den VP-16-Varianten, sowie die von Webb et al. durchgeführten Experimente mit VP-16-Varianten, bestätigen diese Annahme.

In unseren Experimenten kann ER β den AP-1-Promotor mit Antiöstrogenen allerdings nur in U2-OS-Zellen stimulieren. In SK-BR-3-Zellen wirkt ER β mit Antiöstrogenen reprimierend auf die Promotoraktivität. Die Regulation des AP-1-Promotors kann daher nicht allein durch eine Titration von Korepressoren erklärt werden. Vermutlich konkurriert ER β in SK-BR-3-Zellen mit dem AP-1-Komplex um eine begrenzte Menge an Koaktivatoren. Falls dies der Fall ist, sollte sich die Repression durch die Kofaktoren aufheben lassen. Da Antiöstrogene die Bindung von p160-

Koaktivatoren inhibieren (s.o.), kann die Repression erwartungsgemäß nicht durch Kotransfektion von SRC-1 aufgehoben werden (4.1.7).

CBP ist ein essentieller Bestandteil des AP-1-Komplexes und wird durch Östrogenrezeptoren gebunden (Hanstein et al., 1996). Die Kotransfektion von CBP-Expressionsplasmid führt zur Aufhebung der Repression durch ER β /Antiöstrogene (4.1.8). Daher ist anzunehmen, daß ER β in SK-BR-3-Zellen mit dem AP-1-Komplex um eine begrenzte Menge an p300 Koaktivatoren konkurriert.

Bei hohen CBP-Konzentrationen kann ER β den AP-1-Promotor in SK-BR-3-Zellen stimulieren. Daher darf angenommen werden, daß ER β in dieser Zelllinie auch Korepressoren bindet. Vermutlich wird die zellspezifische Regulation durch ER β durch die zellspezifische Expression von Koaktivatoren und Korepressoren bestimmt.

Die Repression durch ER α kann allerdings nicht durch CBP aufgehoben werden. Offenbar erfolgt die Repression durch ER α durch Titration anderer Koaktivatoren. Dafür spricht auch, daß die Deletion von AF1 zu einer Stimulation durch Raloxifen führt.

5.2 Regulation der Promotoren des Progesteronrezeptors

Im vorangegangenen Abschnitt haben wir die Regulation von Modell-Promotoren untersucht, welche durch Östrogenrezeptoren über AP-1- oder ERE-Elemente reguliert werden. Natürliche Promotoren enthalten aber zumeist Bindungsstellen für zahlreiche verschiedene Transkriptionsfaktoren. Es ist daher denkbar, daß sich die Regulation solcher komplexer Promotoren deutlich von der Regulation von einfachen Modell-Promotoren unterscheidet. Wir wollten daher die Frage klären, ob komplexe Promotoren einer unterschiedlichen Regulation durch ER α und ER β unterliegen. Wir haben dazu die Regulation der Promotoren des Progesteronrezeptor-Gens untersucht.

Beim Menschen werden die physiologischen Effekte des Progesterons durch zwei Progesteronrezeptoren (PR) vermittelt, die als PRA und PRB bezeichnet werden. PRA ist eine N-terminal trunke Isoform von PRB, der die Aminosäuren 1-164 von PRB fehlen (Kastner et al., 1990). Beide Isoformen entstehen durch die Transkription des gleichen Gens, unter Nutzung von unterschiedlichen Promotoren (PR_A, PR_B). Sowohl PRA als auch PRB können Progesteron binden und die Transkription einer Vielzahl von Genen regulieren. Das Transaktivierungs-Potential der beiden Varianten unterscheidet sich dabei jedoch in Abhängigkeit von den untersuchten Promotoren und vom Zellkontext (Giangrande und McDonnell, 1999; Meyer et al., 1992; Tora et al., 1988; Vegeto et al., 1993). Im Endometrium gilt Progesteron als Antagonist des Östrogens und wirkt *in vivo* dem proliferativen Effekt des Östrogens entgegen. Reporter-gen-Studien deuten darauf hin, daß die antiproliferative Wirkung des Progesterons durch PRA vermittelt wird (Becker-Andre et al., 1993; Vegeto et al., 1993). PRA kann die Transaktivierung durch ER α blockieren, ohne direkt mit diesem zu interagieren. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen konnte gezeigt werden, daß Progesteron in PRA knockout Mäusen keine antiproliferativen Effekte auf das Endometrium ausübt. Vielmehr führt

Progesteron bei diesen Mäusen in Synergie mit Östrogen zu einer Hyperproliferation des Endometriums (Mulac-Jericevic et al., 2000). Daher darf angenommen werden, daß PRA und PRB unterschiedliche Funktionen in der Reproduktion haben (Conneely et al., 2000).

Eine Östrogen-abhängige Stimulation der PR-Expression konnte für beide PR-Isoformen gezeigt werden (Clarke et al., 1987; Krett et al., 1988; Tibbets et al., 1998). Durch Reporter-gen-Studien konnte nachgewiesen werden, daß ER α die Transkription beider Progesteronrezeptoren stimulieren kann (Kastner et al., 1990). Andere Autoren konnten, unter Verwendung der gleichen Promotorkonstrukte, eine Östrogen-abhängige Stimulation von PR_B, aber nicht von PR_A nachweisen (Graham et al., 1995). Ob ER β an der Regulation der beiden Promotoren beteiligt ist, wurde bisher nicht untersucht.

Wir wollten daher untersuchen ob die beiden Progesteronrezeptor-Promotoren, wie Promotoren mit ERE-Elementen, sowohl durch ER α als auch durch ER β reguliert werden. Dazu haben wir die Regulation dieser beiden Promotoren in Reporter-gen-Studien mit der Regulation eines ERE-abhängigen Promotors verglichen. Dabei zeigte sich eine deutliche ER-vermittelte Regulation nur bei PRB-Luc und für ERE2-TK-Luc, aber nicht bei PRA-Luc.

5.2.1 PR_A wird weder durch ER α noch durch ER β stimuliert

In den beiden Tumor-Zelllinien Ishikawa (Endometrium) und HeLa (Zervix) führt die Transfektion von ER α und ER β zu einer geringfügigen Reduktion der basalen Aktivität des PRA-Promotors. Diese ist vermutlich auf eine Titration von Transkriptionsfaktoren durch den Überschuß an transfiziertem ER zurückzuführen. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß Antiöstrogene diesen Effekt aufheben können. Östrogen kann die Aktivität von PR_A weder über ER α noch über ER β stimulieren. In HeLa-Zellen scheint Östrogen über ER β die Aktivität des PRB-Promotors sogar leicht zu reprimieren (Abbildung 4.2.2.1. und Abbildung 4.2.2.2.). Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die vorliegenden Daten keine klare ER-vermittelte Regulation des PRA-Promotors zeigen. Damit stehen diese Daten im Widerspruch zu Publikationen von anderen Arbeitsgruppen, die eine Stimulation des PRA-Promotors durch ER α in Reporter-gen-Studien nachweisen konnten (Kastner et al., 1990; McNamara und Loughrey, 1998). Andere Autoren konnten mit dem gleichen Promotorkonstrukt eine solche Regulation zwar in einer Ovar-Zelllinie nicht aber bei einer späten Passage von T47D Mammakarzinom-Zellen nachweisen, während die PRB-Expression in beiden Zelllinien durch ER α /E2 stimuliert wird (Graham et al., 1995). Die Regulation des PRA-Promotors wird daher als Zelllinien-spezifisch angesehen. Vermutlich führt eine langfristige Kultivierung von Tumorzellen zu einer Akkumulation von Mutationen, die zu einem Verlust der ER-vermittelten Regulation des PRA-Promotors führen. Da PRA die Östrogen-induzierte Proliferation inhibieren kann, haben Zelllinien bei denen die Expression von PRA nicht durch Östrogen induziert wird, in schnell wachsenden Zellkulturen, möglicherweise einen Selektionsvorteil. Für diese Hypothese spricht auch die

Beobachtung, daß die PRA-Expression bei früheren Passagen von T47D - anders als bei späten Passagen von T47D - durch ER α /E2 stimuliert werden kann (Graham et al., 1995). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien Ishikawa und HeLa bereits seit längerer Zeit in Kultur sind, kann es zu einem Verlust der Östrogen-induzierten PRA-Expression gekommen sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die hier angewendete Methode nicht hinreichend sensitiv ist, um eine geringfügige Stimulation des PRA-Promotors nachzuweisen. Allerdings kann die Stimulation des PRB-Promotors mit dieser Methode in beiden Zelllinie nachgewiesen werden (siehe nächster Abschnitt). Die meisten Autoren vertreten jedoch die Auffassung, daß PRB im Allgemeinen einer wesentlich stärkeren Regulation durch ER α /E2 als PRA unterliegt. Ferner muß darauf hingewiesen werden, daß in vorangegangenen Studien Reporter-Vektoren verwendet wurden, die AP-1-Elemente im Vektoranteil enthielten. Die Bedeutung der AP-1-Elemente für die Genregulation durch ERs war damals noch unbekannt. Es ist unklar, ob dieses AP-1-Element die Regulation des PRA-Promotors beeinflusst hat. In unseren Untersuchungen wurde ein AP-1-Element aus dem Vektoranteil der Reporter-Vektoren eliminiert. Allerdings führte die Eliminierung der AP-1-Elemente weder bei PRA-Luc noch für PRB-Luc zu einer Veränderung der ER-vermittelten Regulation (nicht gezeigt).

5.2.2 Stimulation von PR_B durch Östrogen

In unseren Experimenten war die Aktivität von PR_B etwa viermal höher als die Aktivität von PR_A. Anders als PR_A unterliegt PR_B sowohl in HeLa als auch in Ishikawa-Zellen einer Regulation durch Östrogen und Antiöstrogene. Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede in der Regulation durch ER α und ER β . In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten kann Östrogen die Aktivität von PR_B über ER α stimulieren (Kastner et al., 1990). Hingegen kann ER β /E2 den PRB-Promotor nicht stimulieren.

Der Rezeptorspezifität der Östrogenwirkung auf den PRB-Promotor müssen Unterschiede in der Rezeptorstruktur zugrunde liegen. Um diese Unterschiede aufzuklären, haben wir untersucht, ob die Regulation des PRB-Promotors über die gleichen Aktivierungsfunktionen erfolgt wie die Regulation von Promotoren mit ERE-Elementen. Dazu wurden zunächst die Bedeutung der AF1- und AF2-Domäne von ER α bei der Regulation eines Promotors mit ERE-Elementen untersucht. Wie bereits zuvor von anderen Autoren gezeigt (Tzuckerman et al., 1994), können auch in unseren Experimenten Promotoren mit ERE-Elementen durch beide ERs Östrogen-abhängig stimuliert werden (Abbildung 4.2.4.1, Vergleiche auch Abbildung 4.1.2.2). Die Deletion der AF1-Domäne von ER α führt zu einer schwächeren Transaktivierung. Daher darf davon ausgegangen werden, daß AF1 in dieser Zelllinie an der Transaktivierung beteiligt ist. Eine ER β -Variante ohne AF1 wurde nicht verwendet, da bekannt ist, daß ER β nur minimale AF1-Aktivität aufweist, die Promotoren mit ERE-Elementen stimulieren kann (Cowley und Parker, 1999). Nach Ansicht der meisten Autoren unterscheiden sich ER α und ER β bezüglich der Regulation von Promotoren mit ERE-Elementen nur hinsichtlich ihrer AF1-Aktivität. Es

entspricht daher unseren Erwartungen, daß in unseren Experimenten bei der Regulation des ERE2-TK-Promotors keine signifikanten Unterschiede zwischen ER α Δ AF1 und ER β zu erkennen sind.

Außerdem wurde eine ER α -Variante ohne AF2 (Stopcodon bei Basenpaar 534) kotransfiziert. Diese Variante kann Östrogen mit der gleichen Affinität wie der WT-Rezeptor binden ($K_d < 1$ nM) und besitzt eine intakte Dimersierungs-Domäne. Es konnte gezeigt werden, daß diese Variante keine p160-Koaktivatoren binden kann und daher an Promotoren mit ERE-Elementen inaktiv ist (Halachmi et al., 1994). In anderen Arbeiten wurde eine andere AF2-defiziente Variante von ER α verwendet, bei denen die p160 Bindung durch Punktmutationen in der AF2 verhindert wird, ohne daß der ER dadurch verkürzt wird. Diese Varianten können in einigen Zelllinien die Aktivität von ERE-abhängigen Promotoren über die AF1-Domäne von ER α stimulieren (Zou et al., 1999). Obwohl die AF1-Domäne von ER α in Ishikawa-Zellen funktionell aktiv zu sein scheint (vergleiche ER α und ER α Δ AF1), konnten wir jedoch, in Übereinstimmung mit der Erstbeschreibung dieser Variante, keine Östrogen-abhängige Transaktivierung durch unsere Δ AF2-Variante nachweisen. Statt dessen zeigt ER α Δ AF2/E2 eine Repression der Promotoaktivität (Abbildung 4.2.4.1.). Daher ist anzunehmen, daß zwischen der von uns verwendeten trunkierten Δ AF2-Variante und der punktmultierten Δ AF2-Variante funktionelle Unterschiede bestehen. Vermutlich führt die Deletion des C-Terminus zu weitreichenden Veränderungen der Rezeptorstruktur, deren Konsequenzen (anders als bei der punktmultierten Variante) über den Verlust der p160-Affinität hinaus geht. Möglicherweise führt dies zu einer erhöhten Affinität zu Korepressoren, welche die Promotoraktivität reprimieren und die Stimulation durch AF1 überlagern. Eine vergleichbare trunkierte ER β Variante ohne AF2-Domäne (Stoppcodon bei Aminosäure 438) bewirkt mit Östrogen ebenfalls eine Repression der Promotoraktivität.

Die gleichen Varianten wurden auch mit PR_B-Luc kotransfiziert (Abbildung 4.2.5.1.). Während ER α und ER β in Ishikawa-Zellen nur geringfügige Unterschiede in der Regulation des ERE2-TK-Promotors zeigen, sind die Unterschiede bei der Regulation des PR_B-Promotors deutlicher. Wie zuvor gezeigt, kann Östrogen die Aktivität von PR_B-Luc nur über ER α aber nicht über ER β stimulieren. Im Gegensatz zu ER α bewirkt ER α Δ AF1 keine Östrogen-abhängige Stimulation des PR_B-Promotors, während die Stimulation durch Antiöstrogene im Vergleich zu ER α leicht gesteigert ist. Hingegen scheint die Aktivität von ER α Δ AF2/E2 im Vergleich zu ER α /E2 sogar etwas erhöht zu sein. Damit unterscheidet sich die Regulation von PR_B in Ishikawa-Zellen signifikant von der Regulation des ERE2-TK-Promotors in der gleichen Zelllinie. Während Östrogen die Aktivität des ERE2-TK-Promotors in Ishikawa-Zellen über AF1 und AF2 stimuliert, wird PR_B nur über die AF1 stimuliert. Der Regulation dieser beiden Promotoren müssen also zwei verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Zu unserer Überraschung kann ER β Δ AF2 - anders als ER β - PR_B auch mit Östrogen stimulieren. ER β Δ AF2 hat zudem mit allen Liganden eine deutlich größerer Aktivität als ER β . Eine sehr ähnliche Regulation lässt sich auch für die Varianten von ER β 2 nachweisen.

Die Regulation von Promotoren ohne ERE-Elemente wird als Zelllinien-spezifisch angesehen. So konnte z.B. gezeigt werden, daß Promotoren mit AP-1-Elementen in manchen Zelllinien durch ER α /E2 stimuliert werden, während sie in anderen Zelllinien reprimiert werden (Paech et al., 1997). Wir wollten zeigen, ob dies auch für den PRB-Promotor gilt. Daher wurde das Experiment mit Karzinomzelllinien aus verschiedenen Geweben wiederholt. Dazu wurden HeLa- (Zervix), Hey- (Ovar) und BT20- (Brust) Zellen verwendet (Abbildung 4.2.5.2.). Wie bei Ishikawa-Zellen ist die Östrogen-vermittelte Stimulation des PRB-Promotors bei allen drei Zelllinien von AF1-abhängig aber unabhängig von AF2. Darüber hinaus scheint die AF2 von ER α die AF1 in manchen Zelllinien zu reprimieren. Dieser Effekt ist insbesondere bei BT20-Zellen zu erkennen. In dieser Zelllinie kann ER α Δ AF2/E2 den PRB-Promotor deutlich effektiver stimulieren als ER α /E2 (2-fach/18-fach). Dieser Effekt scheint jedoch Zelllinien-spezifisch zu sein, in HeLa und Hey-Zellen führt die Deletion von AF2 nicht zu einer gesteigerten Promotoraktivität. Anders als bei Ishikawa-Zellen hat ER α Δ AF1 bei allen drei Zelllinien mit allen Liganden eine deutlich geringere Aktivität als ER α .

Der genaue Mechanismus der Stimulation des PRB-Promotors durch die AF1 von ER α ist nicht bekannt. Eine ER α -Selektivität der Östrogenwirkung konnte bereits zuvor für Promotoren gezeigt werden, die kein ERE-Element enthalten. So konnte z.B. gezeigt werden, daß Östrogen Promotoren die SF-response oder AP-1-Elemente enthalten, nur über ER α stimulieren kann (Paech et al., 1997; Vanacker et al., 1999). Eine ähnliche Regulation ist auch für Promotoren gefunden worden, die SP-1 Bindungsstellen enthalten (Saville et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, daß die Stimulation bei allen untersuchten Promotoren mit solchen Elementen von AF2-abhängt. Bei unseren Experimenten zeigte sich jedoch auch, daß die Östrogen-abhängige Stimulation des PRB-Promotors nur durch AF1 vermittelt wird. Es ist daher anzunehmen, daß die Stimulation des PRB-Promotors über alternative Elemente bzw. Regulationsmechanismen erfolgt. Der genaue Mechanismus der Stimulation wird durch unsere Experimente nicht aufgeklärt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß Unterschiede in den A/B-Regionen von ER α und ER β der Schlüssel zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen sein könnten. Vergleichende Studien von ER α und ER β haben gezeigt, daß die N-Termini nur geringe Homologie zueinander aufweisen. Die AF1 von ER β enthält lediglich ein kurzes transaktivierendes Sequenzmotiv, welches auch in der AF1 von ER α gefunden wird. Hingegen besteht die funktionell aktive AF1-Domäne von ER α aus mehreren transaktivierenden Bereichen, die Zelllinien-spezifisch in unterschiedlichem Umfang zur Transaktivierung beitragen (Delaunay et al., 2000). Außerdem konnten Kofaktoren identifiziert werden, die nach Östrogenbindung nur mit der AF1 von ER α aber nicht mit der AF1 von ER β interagieren können (Webb et al., 1998). Vermutlich sind solche ER α -spezifischen Interaktionen die Ursache für die spezifische Transaktivierung des PRB-Promotors durch ER α . Rezeptor-Varianten mit diskreten Mutationen im N-Terminus können möglicherweise dabei helfen, die beteiligten Kofaktoren zu identifizieren. Außerdem können

Mutationsstudien des PRB-Promotors dabei helfen, die zugrundeliegenden Interaktionen aufzuklären. Soweit bekannt, ist dies die erste Beschreibung eines Promotors, bei dem die Östrogen-abhängige Stimulation ausschließlich durch die AF1 von ER α erfolgt.

5.2.3 Repression von PR_B durch Östrogen

Die Experimente wurden in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3 wiederholt (Abbildung 4.2.6.1.). Zu unserer Überraschung kann ER α /E2 die Aktivität des PRB-Promotors in dieser Zelllinie nicht stimulieren. Statt dessen reprimiert ER α /E2 die Aktivität des PRB-Promotors um etwa 50%. Anders als ER α /E2 zeigt ER α Δ AF2/E2 diese Repression nicht. Vielmehr kann ER α Δ AF2/E2 die Aktivität von PRB-Luc effektiv stimulieren (ca. 7-fach). ER β /E2 kann die Aktivität des PRB-Promotors sogar noch deutlicher reprimieren als ER α /E2. Wie bei ER α kann auch bei ER β die Repression durch Deletion der AF2 aufgehoben werden. ER α Δ AF1/E2 kann die Aktivität des PRB-Promotors nicht stimulieren und wirkt wie ER α /E2 repressiv. Diese Daten zeigen, daß die Östrogen-abhängige Repression des PRB-Promotors in SK-BR-3-Zellen durch die AF2 von ER α und ER β vermittelt wird. Welche Kofaktoren an die AF2-Domäne binden und damit die Repression des PRB-Promotors vermitteln ist unklar. Die p160-Koaktivatoren sind potentielle Mediatoren der Repression, da sie Östrogen-abhängig an die AF2 binden und die Stimulation von Promotoren mit ERE-Elementen vermitteln. Daher wurden die Experimente mit ER β in SK-BR-3-Zellen unter Kotransfektion von steigenden Mengen an SRC-1-Expressionsplasmiden wiederholt. Dabei zeigte sich eine Verstärkung der durch Östrogen-vermittelten Repression (Abbildung 4.2.7.1.). Die Repression des PRB-Promotors kann daher nicht auf eine Titration von limitierenden Mengen an SRC-1 zurück zu führen sein. Möglicherweise fördert die SRC-1 die Bindung von weiteren Transkriptionsfaktoren, die dann dem PRB-Promotor nicht mehr zur Verfügung stehen.

Aufgrund der Zelllinienspezifität der AF2-vermittelten Repression muß angenommen werden, daß die Repression des PRB-Promotors durch Zelllinien-spezifische Faktoren vermittelt wird. Der genaue Mechanismus der AF2-vermittelten Repression ist nicht klar. Die Regulation des PRB-Promotors in SK-BR-3-Zellen zeigt jedoch auffällige Parallelen zur Regulation des AP-1-Promotors in SK-BR-3. Wie bei der Regulation von AP-1-Luc (4.1.5) kann ER α VP16 die Aktivität des PRB-Promotors nicht effektiver stimulieren, sondern ist deutlich weniger aktiv als ER α . Daher muß angenommen werden, daß ER α nicht direkt an den Promotor bindet. Außerdem wird die durch ER β vermittelte E2-abhängige Repression des PRB-Promotors wie beim AP-1-Promotor durch Kotransfektion mit SRC-1 verstärkt. Zudem führt die Deletion der AF2-Domäne in SK-BR-3-Zellen am AP-1-Element wie am PRB-Promotor zu einer Aufhebung der Repression durch beide ERs (Vergleiche Abbildung 4.1.6.1 und Abbildung 4.2.5.2). Eine vergleichbare Repression konnte auch für den Promotor des Tumornekrosis-Faktor- α (TNF- α) gezeigt werden. Wie die Repression des PRB-Promotors ist die Repression des TNF- α -Promotors von AF2-abhängig und wird durch Kotransfektion mit SRC-1

verstärkt (An et al., 1999). Ebenso kann ER β den TNF- α -Promotor effektiver reprimieren als ER α . Es konnte gezeigt werden, daß ein AP-1-ähnliches Promotorelement für die Repression dieses Promotors essentiell ist. Es überrascht daher nicht, daß der PRB-Promotor ebenfalls Sequenzmotive mit Homologie zu AP-1-Elementen beinhaltet. Daher ist anzunehmen, daß die Repression von PR_B zumindest teilweise auf eine Interaktion der ERs mit dem AP-1-Komplex zurückzuführen ist. Allerdings sind bei der Regulation von PRB-Luc und AP-1-Luc auch deutliche Unterschiede zu erkennen. So können die Antiöstrogene in SK-BR-3-Zellen den PRB-Promotor, aber nicht den AP-1-Promotor über ER α stimulieren. Außerdem kann ER β 2/E2 den AP-1-Promotor, aber nicht den PRB-Promotor stimulieren. Daher ist anzunehmen, daß die Regulation des PRB-Promotors nicht ausschließlich über AP-1-Elemente erfolgt, sondern - wie auch für den TNF- α Promotor gezeigt - weitere Promotor-Elemente zur Regulation des PRB-Promotors beitragen. Der Promotor enthält teilweise oder voll konservierte Bindungsstellen für zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren. Um zu klären, welche dieser Transkriptionsfaktoren an der AF2-abhängigen Repression beteiligt sind, muß eine Mutationsanalyse des PRB-Promotors durchgeführt werden.

5.2.4 Stimulation von PR_B durch Antiöstrogene

Die Antiöstrogene Tamoxifen und Raloxifen können über ER α auf Promotoren mit ERE-Elementen Zelllinien-spezifisch als Östrogen-Agonisten oder -Antagonisten wirken, während sie über ER β reine Östrogen-Antagonisten sind (Cowley und Parker, 1999). Bei unseren Experimenten bewirkten die Antiöstrogene über keinen der Rezeptoren einen agonistischen Effekt auf den ERE2-TK-Promotor. Hingegen können die Antiöstrogene den PRB-Promotor in der gleichen Zelllinie sowohl über ER α als auch über ER β effektiv stimulieren. Außerdem bestehen gravierende Unterschiede zwischen der Stimulation von PR_B durch Östrogen und Antiöstrogene. Während für die Stimulation und Repression des PRB-Promotors durch Östrogen AF1 bzw. AF2 benötigt wird, führt die Deletion von AF1 und AF2 nicht zu einem Verlust der Stimulation durch Antiöstrogene. In Ishikawa-Zellen können ER α Δ AF1 und ER α Δ AF2 den PRB-Promotor sogar deutlich effektiver stimulieren als ER α (Abbildung 4.2.5.1.). Antiöstrogene können den PRB-Promotor auch in SK-BR-3-Zellen stimulieren, in denen Östrogen als Repressor wirkt (Abbildung 4.2.6.1.). Daher muß angenommen werden, daß die Regulation von PR_B durch Östrogen und SERMs über unterschiedliche Mechanismen erfolgt. Die Regulation des PRB-Promotors in SK-BR-3-Zellen ist das exakte Gegenteil der Regulation des ERE-Promotors in der gleichen Zelllinie (Vergleiche Abbildung 4.1.2.2 und Abbildung 4.2.6.1.). Eine solche „reverse Pharmakologie“ konnte auch schon für andere Promotoren ohne ERE-Elemente gezeigt werden, die molekularen Grundlagen dieser Regulation sind aber noch unklar (Paech et al., 1997) (Zou et al., 1999). Möglicherweise nehmen die ERs nach Bindung der SERMs eine Ligand spezifische Konformation ein, die eine Titration von Korepressoren bewirkt und den Promotor damit aktiviert (Lavinsky et al., 1998). In BT20-Zellen kann der PRB-Pomotor mit Antiöstrogenen nur über

ER α aber nicht ER β stimuliert werden. Daher kann postuliert werden, daß es einen ER α -spezifischen Weg der Stimulation durch Antiöstrogene geben muß.

5.2.5 Modell der Regulation von PR_B

Die vorliegenden Daten ermöglichen es, ein vorläufiges Modell der Regulation des PR_B-Promotors durch Östrogen zu erstellen. Nach diesem Modell wird die Aktivität des PR_B-Promotors in den von uns untersuchten Zelllinien in einem AF1-abhängigem Mechanismus stimuliert und (zumindest bei einigen dieser Zelllinien) durch die AF2 von ER α und ER β reprimiert (z.B. über AP-1-Elemente). Die Repression ist vor allem in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3 deutlich zu erkennen. In dieser Zelllinie wird die AF1-vermittelte Stimulation durch die AF2-vermittelte Repression überlagert, so daß als Nettoeffekt eine Repression des PR_B-Promotors zu verzeichnen ist. Die Deletion der AF2 von ER α führt in dieser Zelllinie zu einem Verlust der Repression und damit effektiv zu einer Stimulation durch die AF1 (Abbildung 4.2.6.1.). In BT20-Zellen dominiert hingegen die Stimulation durch AF1 gegenüber der Repression durch AF2, so daß netto eine Stimulation durch ER α zu verzeichnen ist. Durch die Deletion der AF2 kommt es in dieser Zelllinie daher zu einer deutlichen Steigerung der AF1-vermittelten Stimulation. Da ER β nur eine äußerst schwache AF1-Domäne besitzt, wirkt Östrogen in dieser Zelllinie über ER β repressiv auf PR_B ein (Abbildung 4.2.5.2.c). In Hey-Zellen hat die AF2 hingegen keinen reprimierenden Einfluß auf die Transaktivierung durch ER α .

Soweit bekannt ist dies die erste Beschreibung eines Promotors, der durch die beiden Aktivierungsfunktionen von ER α auf unterschiedliche Weise reguliert wird. Vermutlich dominiert *in vivo* in Abhängigkeit vom Zelltyp, entweder die Östrogen-abhängige Stimulation über AF1 oder die Repression durch AF2. Da ER β mit Östrogen nach diesem Modell nur repressiv (oder neutral) wirken kann, dürfte auch die gewebespezifische Expression von ER α und ER β für die Regulation von Bedeutung sein.

Nach unserem Modell kann Östrogen PR_B in Abhängigkeit vom Zellkontext stimulieren oder reprimieren. Eine vergleichbare Zelllinienspezifität konnte auch für andere Östrogen-regulierte Promotoren ohne ERE-Element nachgewiesen werden (Gottlicher et al., 1998). Vermutlich bestimmt die Zelllinien-spezifische Expression von Kofaktoren (und deren Aktivität) die Wirkung der ERs bei der Regulation dieser Promotoren. Die ERs sind somit nachgeordnete (konditionelle) Faktoren bei der Regulation dieser Promotoren, da ihre Wirkung bei der Regulation dieser Promotoren von anderen (zellspezifischen) Faktoren bestimmt wird. Auf Promotoren mit ERE-Elementen wirken die ERs mit Östrogen obligat als Stimulatoren der Promotoraktivität und sind daher vorrangige (nicht konditionelle) Faktoren. Da die meisten Östrogen-regulierten Promotoren keine ERE-Elemente enthalten, dürfte die konditionelle Regulation von erheblicher Bedeutung für die physiologischen und pathologischen Wirkungen des Östrogens sein. Die Identifikation von Faktoren, welche die Aktivität

der ERs modifizieren, ist daher ein wichtiger Schritt zu einem besseren Verständnis der Wirkungen von Östrogenen und Antiöstrogenen.

5.2.6 Physiologische Relevanz der Experimente

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode kann die Regulation des PRB-Promotors *in vivo* nur eingeschränkt wiedergeben. Dafür sind mehrere Gründe zu nennen:

Die Größe des klonierten Promotors ist relativ willkürlich festgelegt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß *in vivo* weitere regulatorische Elemente an der Regulation des PRB-Promotors beteiligt sind, die jenseits des klonierten Promotors lokalisiert sind. Anders als andere Promotor-Elemente können ERE-Elemente die Aktivität eines Promotors über mehrere kb stimulieren. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich PRA- und PRB-Promotor *in vivo* gegenseitig beeinflussen. Anhand von quantitativen RT-PCR Analysen konnte jedoch gezeigt werden, daß die Expression von PRA und PRB *in vivo* separat reguliert wird. Da Östrogen die PR-Expression in einigen Zelltypen *in vivo* sogar reprimieren kann, ist eine Regulation über ein ERE-Element zudem unwahrscheinlich.

Die Transfektion von Transkriptionsfaktoren führt vermutlich zu einer starken Überexpression dieser Transkriptionsfaktoren in den transfizierten Zellen. Möglicherweise führt dies zu einer Titration von anderen Transkriptionsfaktoren und damit zu einer unphysiologischen Modifikation der Promotoraktivität. Die Regulation der ERE2-TK-Promotors wird in SK-BR-3-Zellen durch eine Veränderung der transfizierten ER α Menge allerdings nicht verändert (Gläser, 2001). Die für unsere Untersuchungen gewählten Mengen an Transkriptionsfaktoren wurden in Anlehnung an vorangegangene Studien festgelegt (Paech et al., 1997).

Auf chromosomaler Ebene spielt auch die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen eine Rolle bei der Regulation von Promotoren. Da für unsere Experimente Reporterplasmide transfiziert wurden, kann diese Ebene der Regulation von unseren Experimenten nicht erfaßt werden.

Die Relevanz des vorgeschlagenen Modells zur Regulation des PRB-Promotors muß daher durch weitere experimentelle Befunde bestätigt werden. Zur Bestätigung des Modells müssen vor allem die folgenden Postulate dieses Modells erfüllt werden:

- 1) Die Expression von PRB kann durch Östrogen, in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp, entweder reprimiert oder stimuliert werden.
- 2) Die Östrogen-abhängige Repression des PRB-Promotors erfolgt vermutlich vor allem durch ER β .
- 3) Die Östrogen-abhängige Stimulation der PRB-Expression erfolgt durch ER α .

Diese Aussagen werden durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen untermauert:

Im Endometrium wird der PR sowohl in Stroma-Zellen als auch in epithelialen Zellen exprimiert. Östrogen induziert die PR-Expression in Stroma-Zellen, aber reprimiert die Expression im luminalen Epithel (1) (Tibetts 1998, Biol Reprod). Es wurde vorgeschlagen, daß die Östrogen-abhängige Repression durch ER β vermittelt wird, da diese Repression bei ER β knockout Mäusen nicht beobachtet wird (2) (Weihua et al., 2000). Die Stimulation der PR-Expression in den Stroma Zellen des Endometriums ist bei ER β knockout Mäusen intakt (3). Mittlerweile sind mehrere Promotoren untersucht worden, die keine ERE-Elemente enthalten aber durch Östrogen stimuliert werden. Keiner dieser Promotoren konnte durch ER β /E2 stimuliert werden. Es wurde daher postuliert, daß eine Stimulation durch ER β /E2 auf Promotoren mit ERE-Elementen beschränkt ist (3)(Vanacker et al., 1999). Eine ER α -spezifische Östrogen-vermittelte Stimulation von Promotoren kann möglicherweise auch die Uterus-Fehlbildungen bei ER α knockout Mäusen erklären. Offenbar kann ER β eine Reihe der Funktionen von ER α nicht übernehmen, obwohl ER β im Uterus exprimiert wird. In ER β knockout Mäusen kommen keine entsprechenden Uterus-Fehlbildungen vor.

6 Zusammenfassung

Die physiologischen Effekte von Östrogen werden durch zwei Ligand-induzierte Transkriptionsfaktoren, die Östrogenrezeptoren ER α und ER β vermittelt. Diese regulieren die Expression von Genen durch DNA-Bindung an estrogen responsive elements (EREs) mit anschließender Rekrutierung eines Transkriptionskomplexes. Außerdem können die beiden Rezeptoren die Aktivität von heterologen Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (Fos/Jun) modifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Reporter-gen-Technologie eingesetzt, um verschiedene Mechanismen der Genregulation durch ER α und ER β miteinander zu vergleichen.

Während ein Promotor mit ERE-Elementen sowohl durch ER α als auch durch ER β Östrogen-abhängig stimuliert wird, kann ein Promotor mit AP-1-Elementen in den von uns untersuchten Zelllinien durch keinen der beiden ERs Östrogen-abhängig stimuliert werden. ER β 2 - eine Splice-Variante von ER β mit niedriger Aktivität am ERE-Element - kann Promotoren mit AP-1-Elementen allerdings effektiv stimulieren. SRC-1, ein Koaktivator der Östrogenrezeptoren an ERE-regulierten Promotoren, kann diese Stimulation unterdrücken. Außerdem wirkt SRC-1 über AP-1-Elemente als Korepressor von ER β aber nicht von ER α . Antiöstrogene können den AP-1-Promotor nur über ER β stimulieren. Alle drei Östrogenrezeptoren binden in den von uns untersuchten Zelllinien offenbar nicht direkt an den AP-1-Komplex. Statt dessen wird ein Modell der Regulation durch Titration von Ligand- und Rezeptor-spezifischen Kofaktoren vorgeschlagen.

Der proximale Promotor des Progesteronrezeptors (PR $_B$, ohne ERE) wird nur durch ER α Östrogen-abhängig stimuliert. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, daß die Stimulation von PR $_B$ ausschließlich durch die N-terminale A/B-Domäne von ER α vermittelt wird. Soweit bekannt ist dies die erste Beschreibung eines neuen Regulationsmechanismus, bei dem die Östrogen-abhängige Stimulation unabhängig von AF2 erfolgt. Die C-terminale AF2-Domäne kann die Promotoraktivität in einigen Zelllinien reprimieren. Daher führt die Deletion der AF2-Domäne in diesen Zelllinien zu einer stärkeren Stimulation durch ER α . In einer der untersuchten Zelllinie dominiert die Repression durch AF2 gegenüber der Stimulation durch AF1. Erst nach Deletion von AF2 kann ER α PR $_B$ in dieser Zelllinie stimulieren.

Anders als bei der Regulation von Promotoren mit ERE-Elementen zeigen die Östrogenrezeptoren bei der Regulation von Promotoren ohne EREs eine ausgeprägte Zelllinien-Spezifität. Kotransfektions-Experimente deuten darauf hin, daß die Zelllinien-Spezifität durch die Verfügbarkeit spezifischer Kofaktoren bestimmt wird. Die nicht ERE-abhängige Genregulation kann daher die zell- bzw. gewebespezifische Wirkung von Östrogenen und Antiöstrogenen besser erklären als die klassische Regulation über ERE-Elemente. Da die meisten Östrogen-regulierten Gene keine ERE-Elemente enthalten, ist die Identifikation von Faktoren, welche die Aktivität der ERs bestimmen, ein wichtiger Schritt zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Östrogenen und Antiöstrogenen.

7 Literatur

Alland, L., Muhle, A. und Hou, H.J. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* (1997), 387: 49-55.

An, J., Ribeiro, R.C.J., Webb, P., Gustafsson, J.A., Kushner, P.J., Baxter, J.D. und Leitmann, D.C. Estradiol repression of tumor necrosis factor-alpha transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators. *PNAS* (1999), 96(26): 15161-6.

Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M. und Meltzer, P.S. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* (1997), 277(5328): 965-8.

Baniahmad, A. und Tsai, M.J. Mechanisms of transcriptional activation by steroid hormone receptors. *J Cell Biochem* (1993), 51(2): 151-6.

Bannister, A.J. und Kouzarides, T. The CBP co-activator is a histone acetyl-transferase. *Nature* (1996), 384: 641-3.

Bautista, S., Valles, H., Walker, R.L., Anzick, S., Zeillinger, R., Meltzer, P. und Theillet, C. In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res* (1998), 4(12): 2925-9.

Beato, M., Herrlich, P. und Schutz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* (1995), 83(6): 851-7.

Beatson. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* (1896), 2: 104-7.

Becker-Andre, M., Andre, E. und DeLamarter, J.F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun* (1993), 194(3): 1371-9.

Beckmann, M.W., Niederacher, D. und Bender, H.G. Mechanisms of steroid hormone action and resistance in endometrial and breast cancer. *Eur J Cancer Prev* (1998), 7 Suppl 1: S25-8.

Beckmann, M.W., Niederacher, D., Schnurch, H.G., Gusterson, B.A. und Bender, H.G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* (1997), 75(6): 429-39.

Blumberg, B., Kang, H. und Bolando, J. BXR, an embryonic orphan nuclear receptor activated by a novel class of endogenous benzoate metabolites. *Genes Dev* (1998), 12: 1269-77.

- Bocquel, M.T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P. und Gronemeyer, H.** The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* (1989), 17(7): 2581-95.
- Boyd, D., Manoil, C. und Beckwith, J.** Determinants of membrane protein topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1987), 84(23): 8525-9.
- Boyd, S.** On oophorectomy in cancer of the breast. *Br Med J* (1900), 2: 1161-7.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. und Carlquist, M.** Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* (1997), 389(6652): 753-8.
- Buick, R.N., Pullano, R. und Trent, J.M.** Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* (1985), 45(8): 3668-76.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J. und Picard, D.** Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J* (1996), 15(9): 2174-83.
- Byers, M., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A. und Park-Sarge, O.K.** Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol* (1997), 11(2): 172-82.
- Chang, C.S., Kokontis, J. und Liao, S.T.** Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988), 85(19): 7211-5.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. und Evans, R.M.** Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* (1997), 90(3): 569-80.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D. und Evans, R.M.** Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* (1999), 98: 675-86.
- Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E. und Shaul, P.W.** Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* (1999), 103(3): 401-6.
- Chu, S. und Fuller, P.J.** Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol* (1997), 132: 195-9.
- Ciocca, D.R. und Fanelli, M.A.** Estrogen receptor and cell proliferation in breast cancer. *TEM* (1997), 8(8): 313-21.

Clarke, C.L., Feil, P.D. und Satyaswaroop, P.G. Progesterone receptor regulation by 17 beta-estradiol in human endometrial carcinoma grown in nude mice. *Endocrinology* (1987), 121(5): 1642-8.

Cohen, S.M. und Ellwein, L.B. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res* (1991), 51(24): 6493-505.

Collins, P. und Webb, C. Estrogen hits the surface. *Nat Med* (1999), 5(10): 1130-1.

Conneely, O.M., Lydon, J.P., De Mayo, F. und O'Malley, B.W. Reproductive functions of the progesterone receptor. *J Soc Gynecol Investig* (2000), 7(1 Suppl): S25-32.

Cooney, A.J., Leng, X., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. und Tsai, M.J. Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* (1993), 268(6): 4152-60.

Cooney, A.J., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. und Tsai, M.J. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol* (1992), 12(9): 4153-63.

Couse, J., Curtis, S. und Bunch, D. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking ERalpha and beta. *Science* (1999), 286: 2328-31.

Couse, J.F., C.S., H. und Korach, K.S. Receptor null mice reveal contrasting roles for ERalpha and beta in reproductive tissues. *J Ster Biochem Mol Biol* (2000), 74: 287-96.

Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A. und Korach, K.S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* (1997), 138(11): 4613-21.

Coutts, A., Leygue, E. und Murphy, L. Mechanisms of hormone independence in human breast cancer cells. *88th meeting of AACR* (1988), 88: 296.

Cowley, S.M. und Parker, M.G. A comparison of transcriptional activity by ERalpha and ERbeta. *J. Ster Biochem Mol Biol* (1999), 69: 165-75.

Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M. und Gustafsson, J.A. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol* (2000), 58(3): 584-90.

Delmas, P.D., Bjarnason, N.H., Mitlak, B.H., Ravoux, A.C., Shah, A.S., Huster, W.J., Draper, M. und Christiansen, C. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* (1997), 337(23): 1641-7.

Desai, A., Luqmani, Y., Coope, R., Dagg, B., Gromm, J., Pace, P., Rees, C., Thirunavukkarasu, V., Shousa, S., Groome, N., Coombes, R. und Ali, S. Presence of exon 5 deleted oestrogen receptor in human breast cancer: Functional analysis and clinical significance. *Br J Cancer* (1997), 75: 1173-84.

Devilee, P. und Cornelisse, C.J. Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* (1996), 1198: 113-30.

Dickson, R.B. und Stancel, G.M. Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr* (2000), 27: 135-45.

Doucas, V., Spyrou, G. und Yaniv, M. Unregulated expression of c-jun and c-fos proteins but not Jun D inhibits oestrogen receptor activity in human breast cancer derived cells. *EMBO J* (1991), 10: 2237-45.

Dubrik, D. und Shiu, R.P. Mechanism of oestrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene* (1992), (7): 1587-94.

Dutertre, M. und Smith, C. Molecular mechanisms of selective ER modulator (SERM) action. *JPET* (2000), (295): 431-7.

EBCT-Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* (1992), 339(8785): 71-85.

EBCT-Group. Ovarian ablation in early breast cancer: overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* (1996), 348(9036): 1189-96.

EBCT-Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* (1998), 351(9114): 1451-67.

Eddy, M., Washburn, F. und Buncho, O. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocr* (1996), 137: 4796-805.

Elgort, M.G., Zou, A., Marschke, K.B. und Allegretto, E.A. Estrogen and estrogen receptor antagonists stimulate transcription from the human retinoic acid receptor- α 1 promoter via a novel sequence. *Mol Endo* (1996), 10: 477-87.

Enmark, E. und Gustafsson, J.A. Orphan nuclear receptors--the first eight years. *Mol Endocrinol* (1996), 10(11): 1293-307.

Enmark, E. und Gustafsson, J.A. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* (1999), 246(2): 133-8.

Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M. und Gustafsson, J.A. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* (1997), 82(12): 4258-65.

Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* (1988), 240(4854): 889-95.

Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L. und Wolmark, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* (1998), 90(18): 1371-88.

Flötotto, T., S., D., Gläser, M., Hanstein, B., Niederacher, D., Brumm, C. und Beckmann, M.W. Hormones and hormone antagonists: mechanisms of action in carcinogenesis of endometrial and breast cancer. *Horm Metab Res* (2001), 33: 451-7.

Fuqua, S.A., Fitzgerald, S.D., Allred, D.C., Elledge, R.M., Nawaz, Z., McDonnell, D.P., O'Malley, B.W., Green, G.L. und McGuire, W.L. Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tissues. *Cancer Res* (1992), 52: 483-6.

Fuqua, S.A., Fitzgerald, S.D., Chamness, G.C., Tandon, A.K., McDonnell, D.P., Nawaz, Z., O'Malley, B.W. und McGuire, W.L. Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res* (1991), 51(1): 105-9.

Garfinkel, L., Boring, C.C. und Heath, C.W. Changing trends: an overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer* (1994), 74: 222-28.

Gaub, M.P., Bellard, M., Scheurer, I., Chambon, P. und Sassone, C.P. Activation of the ovalbumine gene by the estrogen receptor involves the fos jun complex. *Cell* (1996), 63: 1267-76.

Geum, D., Sun, W., Paik, S.K., Lee, C.C. und Kim, K. Estrogen induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation in vivo: differential induction mechanism of cyclin D1 and D3. *Mol Reprod Dev* (1997), 46: 450-58.

Giangrande, P.H. und McDonnell, D.P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* (1999), 54: 291-313.

Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. und Evans, R.M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* (1986), 46(5): 645-52.

Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P. und Evans, R.M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* (1987), 330(6149): 624-9.

Giguere, V., Yang, N., Segui, V. und R.M., E. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* (1988), 331: 91-4.

Gläser, M. Analyse der (anti-)östrogenen Wirkmechanismen von Raloxifen und Tamoxifen in Endometrium- und Mammakarzinomen. *Dissertation* (2001), .

Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. The coregulators exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* (2000), 14: 121-41.

Godowski, P.J., Picard, D. und Yamamoto, K.R. Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* (1988), 241(4867): 812-6.

Goldman, P.S., Tran, V.K. und Goodman, R.H. The mutli functional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Rec Prog Horm Res* (1997), 52: 103-9.

Gottardis, M.M. und Jordan, V.C. Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogen administration. *Cancer Res* (1988), 48(18): 5183-7.

Gottlicher, M., Heck, S. und Herrlich, P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* (1998), 76(7): 480-9.

Graham, D.J., Bain, D.L., Richer, J.K., Jackson, T.A., Tung, L. und Horwitz, B.H. Thoughts on tamoxifen resistant breast cancer. Are coregulators the answer or just a red hering ? *J Ster Biochem Mol Biol* (2000), 74: 255-9.

Graham, J.D., Roman, S.D., McGowan, E., Sutherland, R.L. und Clarke, C.L. Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cells. *J Biol Chem* (1995), 270(51): 30693-700.

Grandien, K. Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue specific, estrogene receptor mRNA isoform. *Mol Cell Endocrinol* (1996), 116: 2223-9.

- Grandien, K., Berkenstamm, A., Nilson, S. und Gustafson, J.A.** Estrogen target tissues determines alterantive promotor utilization of the human estrogen receptor gene in human osteoblasts an tumor cell lines. *Endocr* (1993), 10: 269-77.
- Green, S., Kumar, V., Krust, A., Walter, P. und Chambon, P.** Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (1986), 51(Pt 2): 751-8.
- Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. und Chambon, P.** Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* (1986), 24(1): 77-83.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P. und Chambon, P.** Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* (1986), 320(6058): 134-9.
- Greenblatt, J.** RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol* (1997), 9: 310-9.
- Gu, W. und Roeder, R.G.** Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *cell* (1997), 90: 595-606.
- Gu, W. und Shi, X.L.** Synergistic activation of transcription by p53 and CBP. *Nature* (1997), 387: 819-23.
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M. und Milgrom, E.** Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* (1989), 57(7): 1147-54.
- Gustafsson, J.A.** Estrogen receptor beta-a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* (1999), 163(3): 379-83.
- Gustafsson, J.A.** Novel aspects of estrogen action. *J Soc Gynecol Investig* (2000), 7(1 Suppl): S8-9.
- Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C. und Brown, M.** Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* (1994), 264(5164): 1455-8.
- Hall, J.M. und McDonnell, D.P.** The estrogen receptor beta isoform of the human estorogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocr* (1999), 140: 5566-78.
- Hamada, K., Gleason, S.L., Levi, B.Z., Hirschfeld, S., Appella, E. und Ozato, K.** H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989), 86(21): 8289-93.

- Hamilton, T.C., Young, R.C., McKoy, W.M., Grotzinger, K.R., Green, J.A., Chu, E.W., Whang-Peng, J., Rogan, A.M., Green, W.R. und Ozols, R.F.** Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* (1983), 43(11): 5379-89.
- Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R. und Brown, M.** p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996), 93(21): 11540-5.
- Hanstein, B., Liu, H., Yancisin, M.C. und Brown, M.** Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol* (1999), 13(1): 129-37.
- Hayashi, S., K., I., Suga, K., Kurihara, T., Higashi, Y. und Nakachi, K.** Two promoters in expression of human estrogen receptor mRNA in human breast cancer. *Carcinogenesis* (1997), 18: 459-64.
- Heinzel, T., Lavinsky, M. und Mullen, T.M.** A complex containing NcoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* (1997), 387: 43-8.
- Holinka, C.F., Hata, H., Kuramoto, H. und Gurbide, E.** Response to estradiol in a human endometrial carcinoma cell line (Ishikawa). *J.Steroid Biochem* (1987), 24: 85-9.
- Hollenberg, S.M. und Evans, R.M.** Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* (1988), 55(5): 899-906.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L. und Stallcup, M.R.** GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996), 93(10): 4948-52.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K. und et al.** Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* (1995), 377(6548): 397-404.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S. und Tung, L.** Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* (1996), 10(10): 1167-77.
- Hyder, S.M., Chiapetta, C. und Stancel, G.M.** Interaction of human estrogen receptors alpha and beta with the same natural occurring estrogen response elements. *Biochem Biophys Res Com* (1999), 57: 597-601.
- Ikeda, M., Kawaguchi, A., Takeshita, A., Chin, W.W., Endo, T. und Onaya, T.** CBP-dependent and independent enhancing activity of steroid receptor co-activator-1 in thyroid hormone receptor-mediated transactivation. *Mol Cell Endocrinol* (1999), 147: 103-2.

Imhof, A., Yang, X.Y., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P. und Ge, H. Acetylation of general transcription factors by histone acetyl-transferases. *Curr Biol* (1997), 7: 689-92.

Improta-Brears, T., Whorton, A.R., Codazzi, F., York, J.D., Meyer, T. und McDonnell, D.P. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999), 96(8): 4686-91.

Ing, N.H., Beekman, J.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem* (1992), 267(25): 17617-23.

Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P. und Tora, L. Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* (1994), 79(1): 107-17.

Jakacka, M., Ito, M., Weis, J., Chien, P.Y., Gehm, B.D. und Jameson, J.L. Estrogene receptor binding to DNA is not required for the nonclassical AP-1 Pathway. *JBC* (2001), 276(17): 13615-21.

Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W. und DeSombre, E.R. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1968), 59(2): 632-8.

Jenster, G., Spencer, T.E., Burcin, M.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), 94(15): 7879-84.

Jones, P.S., Parrot, E. und White, I.N. Activation of transcription by estrogen receptor ERalpha and beta is cell-type and promoter dependent. *J Biol Chem* (1999), 274: 32008-14.

Jordan, V.C. Antiestrogenic action of raloxifene and tamoxifen: today and tomorrow. *J Natl Cancer Inst* (1998), 90(13): 967-71.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* (1996), 85(3): 403-14.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. und Chambon, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* (1990), 9(5): 1603-14.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H. und et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* (1995), 270(5241): 1491-4.

Katzenellenbogen, B.S. Estrogen receptors: bioactivities and Interaction with cell signalling pathways. *Biol Reprod* (1996), 54: 287-93.

Kee, B.L., Arias, J. und Montminy, M.R. Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* (1996), 271: 2373-5.

Keightley, M.C. Steroid receptor isoforms: exception or rule? *Mol Cell Endocrinol* (1998), 137(1): 1-5.

Klinge, C.M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* (2000), 65: 227-51.

Koelle, M.R., Talbot, W.S., Se Graves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P. und Hogness, D.S. The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* (1991), 67(1): 59-77.

Korach, K.S., Migliaccio, S. und Davis, V.L. Estrogens. In: *Principles of Pharmacology* (1996), : 809-25.

Kozak, C.A., Adamson, M.C. und Weinberger, C. Genetic mapping of gene encoding the farnesyl transferase receptor. *Mamm Genom* (1996), 1996(7): 164-5.

Krett, N., Wei, L., Francis, M.D., Nordeen, S.K., Gordon, D.F., Wood, W.M. und K.B., H. Human progesterone receptors A can be synthesized intracellularly and are biologically functional. *Biochem Biophys Res Commun* (1988), 157: 278-85.

Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., J.M., B. und Chambon, P. The chicken estrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* (1986), 5: 891-7.

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. und Gustafsson, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* (1997), 138(3): 863-70.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. und Gustafsson, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996), 93(12): 5925-30.

Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. und Gustafsson, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* (1998), 139(10): 4252-63.

Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R. und Chambon, P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* (1987), 51(6): 941-51.

Kurokawa, R., Soderstrom, M. und Horlein, A. Polarity-specific activities of retinoid acid receptors determined by a corepressor. *377* (1995), : 451-4.

Kushner, P.J., Agard, D.A., Green, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, K.A., Uht, R.M. und Webb, P. Estrogen receptor to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2000), 74: 311-17.

Lacassagne, A. Apparition de cancers de la mamelle chez la souris mâle, soumise à des injections de folliculine. *C. R. Acad. Sci.* (1932), 195: 630-2.

Lavinsky, R., Jepsen, K. und Heinzel, T. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-coR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci* (1998), 95: 2920-5.

Le Mellay, V., Lasmoles, F. und Lieberherr, M. Galpha(q/11) and gbetagamma proteins and membrane signaling of calcitriol and estradiol. *J Cell Biochem* (1999), 75(1): 138-46.

Lee, S.K., Kim, H.J. und Na, S.J. Steroid receptor co-actiivator-1 co-activates activating ptoein1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *Mol Cell Endocrinol* (1998), 273: 103-12.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M., Mader, S. und et al. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* (1992), 68(2): 377-95.

Lemieux, P. und Fuqua, S. The role of estrogene receptor in tumor progression. *J Ster Biochem Mol Biol* (1996), 56: 87-91.

Leygue, E., Dotzlaw, H., Lu, B., Glor, C., Watson, P.H. und Murphy, L.C. Estrogen receptor beta: mine is longer than yours. *J Clin Endorinol Metab* (1998), 83: 3754-55.

Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, H. und Murphy, C. Expression of Estrogen receptor beta1, beta2 and beta5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer Res* (1999), 59: 1175-9.

Li, H., Gomes, P.J. und Chen, J.D. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), 94(16): 8479-84.

Liu, H.L., Golde-Novoselski, E., Seto, M.H., Webster, L., McClary, J. und Zajchowski, D.A. The novel estrogen-responsive B-box protein (EBBP) gene ist tamoxifen-regulated in cells expressing an estrogen receptor DNA-binding mutant. *Mol endo* (1994), 14: 7134-43.

Lobenhofer, E.K., Huper, G., Iglehart, J.D. und Marks, J.R. Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. *Cell Growth Differ* (2000), 11(2): 99-110.

- Lu, B., Leygue, E., Dotzlaw, H., Murphy, L.J., Murphy, L.C. und Watson, P.H.** Estrogen receptor beta mRNA variants in human and murine tissues. *Mol Cell Endocr* (1998), 138: 199-203.
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sullivan, P.M., Willard, H.F., French, F.S. und Wilson, E.M.** Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* (1988), 240(4850): 327-30.
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R. und Sigler, P.B.** Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* (1991), 352(6335): 497-505.
- Lupulescu, A.** Estrogene use and risk: a review. *Exp Clin Endocrin Diabetes*. (1993), 101: 204-14.
- Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A. und Evans, R.M.** Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* (1992), 6(3): 329-44.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. und et al.** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* (1995), 83(6): 835-9.
- Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, E., Shimaya, S., Hashimoto, S., Kato, S. und Kawashima, H.** A novel Isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem Biophys Res Comm* (1998), 246: 142-47.
- May, F.E. und Westley, B.R.** Estrogen regulated messenger RNAs in human breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* (1995), 49(9): 400-14.
- May, M.** Human TAF(II28) promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid x receptors. *EMBO J.* (1996), 15: 3093-104.
- McDonnell, D.P., Mangelsdorf, D.J., Pike, J.W., Haussler, M.R. und O'Malley, B.W.** Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* (1987), 235(4793): 1214-7.
- McKenna, N.J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W.** Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* (1999), 69(1-6): 3-12.
- McLenna, N.J., Lanz, R.B. und O'Malley, B.W.** Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. *Endocr Rev* (1999), 20: 321-44.

McNamara, P.M. und Loughrey, H.C. Progesterone receptor A and B Isoform Expression in human Osteoblasts. *Calcif Tissue Int* (1998), 63: 39-46.

Mermelstein, P.G., Becker, J.B. und Surmeier, D.J. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* (1996), 16(2): 595-604.

Metzger, D., Ali, S., Bornert, J.M. und Chambon, P. Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem* (1995), 270(16): 9535-42.

Meyer, M.E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.T., Tasset, D. und Chambon, P. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their transcription function. *Cell* (1989), 57: 433-42.

Meyer, M.E., Quirin-Stricker, C., Lerouge, T., Bocquel, M.T. und Gronemeyer, H.A. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor Isoforms. *J Biol Chem* (1992), 267: 10882-7.

Ming, J.T. und O'Mally, B. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* (1994), 63(451-86).

Montano, M.M. und Katzenellenbogen, B.S. The quinone reductase gene: a unique estrogen receptor regulated gene that is activated by antiestrogens. *Proc Natl Acad Sci* (1997), 94: 2581-86.

Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.L., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M. und Willson, T.M. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Comm* (1998), 247: 75-8.

Morley, P., Whitfield, J.F., Vanderhyden, B.C., Tsang, B.K. und Schwartz, J.L. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* (1992), 131(3): 1305-12.

Mosselman, S., Polman, J. und Dijkema, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* (1996), 392(1): 49-53.

Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P. und Conneely, O.M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* (2000), 289(5485): 1751-4.

Murphy, L.C., Leygue, E., Dotzlaw, H., Douglas, D., Coutts, A. und Watson, P.H. Oestrogen receptor variants and mutations in breast cancer. *Ann Med* (1997), 29: 221-34.

Na, S.Y., Lee, S.K., Han, S.J., Choi, H.S., Im, S.Y. und Lee, J.W. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem* (1998), 273(18): 10831-4.

Naar, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* (1991), 65(7): 1267-79.

Nagy, L., Kao, H.Y. und Charkravarti, D. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3a, and histone deacetylase. *Cell* (1998), 89: 373-80.

Norfleet, A.M., Thomas, M.L., Gametchu, B. und Watson, C.S. Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* (1999), 140(8): 3805-14.

Oakley, R., Sar, M. und Cidlowski, J. The human Glucocorticoid receptor isoform: expression, biochemical properties and putative Functions. *J.Biol Chem* (1996), 271: 9550-9.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. und Muramatsu, M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* (1998), 243(1): 122-6.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. und Muramatsu, M. Molecular cloning of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nuc Acid Res* (1998), 26: 3505-12.

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. und Nakatani, Y. The transcriptional co-activators p300 and CBP are histone acetyl-transferases. *Cell* (1996), 87: 953-9.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* (1995), 270(5240): 1354-7.

Osborne, C.K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* (1998), 339(22): 1609-18.

Osborne, C.K. und Fuqua, S.A.W. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Cancer Res Treat* (1994), 32: 49-55.

Otto, C., Reichardt, H. und Schutz, G. Absence of glucocorticoid receptor beta in mice. *J Biol Chem* (1997), 272: 26665-8.

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J. und Scanlan, T.S. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* (1997), 277(5331): 1508-10.

- Park, W., Choi, J., Hwang, E. und Lee, J.** Identification of a wildtype estrogen receptor lacking exon 4 and its coexpression with wildtype estrogen receptor in ovarian carcinomas. *Clin Canc Res* (1996), 2: 2029-35.
- Patrone, C., Ma, Z.Q., Pollio, G., Agrati, P., Parker, M.G. und Maggi, A.** Cross coupling between insulin and estrogen receptor in human neuroblastoma cells. *Mol Endo* (1996), 10: 499-507.
- Perkins, N.D., Felzien, L.K., Betts, J.C., Leung, K., Beach, D.H. und Nabel, G.J.** Regulation of NF-kappaB by cyclin dependent kinases associated with the p300 co-activator. *Science* (1997), 275: 523-7.
- Petersen, D.N., Tkalcevic, G.T., Koza-Taylor, P.H., Turi, T.G. und Brown, T.A.** Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* (1998), 139(3): 1082-92.
- Philips, A., Teyssier, C., Galtier, F., Rivier-Covas, C., Rey, J.M., Rochefort, H. und Chalbos, D.** FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* (1998), 12(7): 973-85.
- Phillips, A., Chalbos, D. und Rochefort, H.** Estradiol increases and anti-estrogens antagonize the growth factor induced activator protein 1 activity in MCF7 breast cancer cells without affecting c-fos and c-jun synthesis. *J Biol Chem* (1993), 269: 14103-108.
- Picard, D. und Yamamoto, K.R.** Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Embo J* (1987), 6(11): 3333-40.
- Pietras, R.J. und Szego, C.M.** Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* (1975), 253(5490): 357-9.
- Pike, A.C.W., Brzozowski, A.M. und Hubbard, R.E.** A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Ster Biochem Mol Biol* (2000), 74: 261-8.
- Pratt, W.B.** The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* (1993), 268(29): 21455-8.
- Pratt, W.B. und Toft, D.O.** Steroid receptor interaction with heat shock protein and immunophilin chaperons. *Endocr Rev* (1997), 18: 306-60.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L. und Levin, E.R.** Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* (1999), 13(2): 307-19.

- Rochefort, H.** Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. *Ciba Found Symp* (1995), 191: 254-65.
- Roeder, R.G.** The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* (1996), 21: 327-35.
- Sadovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J.D., Fitzpatrick, P.M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M.G. und Kushner, P.J.** Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol* (1995), 15(3): 1554-63.
- Sanger, S., Nickel, S. und Coulson, A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* (1977), 74: 5463-67.
- Sar, M. und Welch, F.** Differential expression of ERbeta and ERalpha in the rat ovary. *Endocr* (1999), 140: 963-71.
- Sarrel, P.M., Lufkin, E.G., Oursler, M.J. und Keefe, D.** Estrogen actions in arteries, bone and brain. *Sci Am Sci Med* (1994), 1: 44-53.
- Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J.A. und Safe, S.** Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* (2000), 275(8): 5379-87.
- Shayamala, G.** Roles of estrogen and progesterone in normal mammary gland development. *TEM* (1997), 8: 34-9.
- Shemshedini, L., Kauthe, R., Sassone, C.P., Pomon, A. und Gronemeyer, H.** Cell specific inhibitory and stimulatory effects of fos and jun on transcription activation by nuclear receptors. *EMBO J* (1991), 10: 3839-49.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. und Greene, G.L.** The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* (1998), 95(7): 927-37.
- Smith, C.L., Nawaz, Z. und O'Malley, B.W.** Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* (1997), 11(6): 657-66.
- Smith, C.L., Onate, S.A., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W.** CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996), 93(17): 8884-8.

- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M.** A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* (1973), 51(5): 1409-16.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W.** Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* (1997), 389(6647): 194-8.
- Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R. und Frail, D.E.** A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem* (1998), 273(42): 27645-53.
- Sukovich, D.A., Mukherjee, R. und Benfield, P.A.** A novel, cell-type specific mechanism for estrogen receptor mediated gen activation in the absence of an estrogene responsive element. *Mol Cell Biol* (1994), 14: 7134-143.
- Sutherland, R.L., Owen, W.J., Watts, C.K.W. und Musgrove, E.A.** Estrogene and progesterone regulation of cell cycle progression. *J M Gland Biol Neop* (1998), 3: 63-72.
- Takeshita, A., Cardona, G.R., Koibuchi, N., Suen, C.S. und Chin, W.W.** TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* (1997), 272(44): 27629-34.
- Takeshita, A., Yen, P.M., Misiti, S., Cardona, G.R., Liu, Y. und Chin, W.W.** Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* (1996), 137(8): 3594-7.
- Thompson, D.A., McPherson, L.A., Carmeci, C., deConinck, E.C. und Weigel, R.J.** Identification of two estrogen receptor transcripts with novel 5' exons isolated from an MCF7 cDNA library. *J Steroid Biochem Mol Biol* (1997), 62: 143-53.
- Tibbets, T.A., Mendoza-Meneses, M., O'Malley, B.W. und Coneely, O.M.** Mutual and compartmental regulation of estrogen and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod* (1998), 59: 1143-52.
- Tora, L., Gaub, S., Mader, A., Dierich, M., Bellard, P. und Chambon, C.P.** Cell-specific activity of a GGTC A half-palindromic oestrogen-responsive element in the chicken ovalbumin Gene Promotor. *EMBO J* (1988), 7: 3771-8.
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P. und Chambon, P.** The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* (1988), 333(6169): 185-8.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. und Chambon, P.** The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* (1989), 59(3): 477-87.

Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* (1997), 387(6634): 677-84.

Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F. und Giguere, V. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* (1997), 11(3): 353-65.

Tremblay, G.B., Tremblay, A., Labrie, F. und Giguere, V. Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol Cell Biol* (1999), 19(3): 1919-27.

Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* (1994), 63: 451-86.

Tzuckerman, M.T., Estey, A., Santiso-Mere, D., Daielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W. und McDonnell, D.P. Human estrogen receptor transactivation capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endo* (1994), 8: 1465-73.

Tzuckerman, M., Zhang, X.K., Hermann, T., Wills, K.N., Graupner, G. und Pfahl, M. The human estrogen receptor has transcriptional activator or repressor functions in the absence of ligands. *New Biologist* (1990), 6: 613-20.

Umayahara, Y., Kawamori, R., Watada, H., Imano, E., Iwama, N., Morishima, T., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y. und Kamada, T. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* (1994), 269(23): 16433-42.

Valverde, M.A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M.I., Mann, G.E., Vergara, C. und Latorre, R. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* (1999), 285(5435): 1929-31.

Vanacker, J.M., Pettersson, K., Gustafsson, J.A. und Laudet, V. Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *Embo J* (1999), 18(15): 4270-9.

Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W. und McDonnell, D.P. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* (1993), 7(10): 1244-55.

Verijzer, C.P. und Tjian, R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci* (1996), 21: 338-42.

Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, T.-W., Chambon, P. und Gronemeyer, H. The co-activator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J* (1998), 17: 507-19.

Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P. und Gronemeyer, H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* (1996), 15(14): 3667-75.

Wang, W., Dong, L., Saville, S. und Save, S. Transcriptional activation of gene expression by 17-beta-estradiol in MCF7 cells is regulated by NFY-Sp1/estrogen receptor interactions. *Mol Endo* (1999), 13: 1373-8.

Watanabe, T., Inoue, S., Ogawa, S., Ishi, Y., Hiroi, H., K., I., Orimo, A. und Muramatsu, M. Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, promotor context and estrogene receptor subtype: Functional differences between Estrogene receptors ERalpha and ERbeta. *Biochem Biophys Res Comm* (1997), 236: 140-5.

Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M. und Kushner, P.J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* (1995), 9(4): 443-56.

Webb, P., Nguyen, P. und Shinsako, J. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 co-activator proteins. *Mol Endo* (1998), 12: 1605-18.

Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S. und Kushner, P.J. The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* (1999), 13(10): 1672-85.

Webster, N.J., Green, S., Jin, J.R. und Chambon, P. The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* (1988), 54(2): 199-207.

Wehling, M., Neylon, C.B., Fullerton, M., Bobik, A. und Funder, J.W. Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* (1995), 76(6): 973-9.

Weigel, N.L. und Zhang, Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med* (1998), 76(7): 469-79.

Weihua, Z., Saji, S., Makinen, S., Cheng, G., Jensen, E.V., Warner, M. und Gustafsson, J.A. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), 97(11): 5936-41.

Yang, N., Venugopalan, M., Hardikar, S. und Glasebrook, A. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17-beta-estradiol and raloxifene. *Science* (1996), 273: 1222-25.

Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. und Nakatani, Y.A. p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* (1996), 382: 319-24.

Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Naar, A.M., Kim, S.Y., Boutin, J.M., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* (1991), 67(6): 1251-66.

Zhang, Q.X., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A.W. und Borg, A. *Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual tumors* (1996), *J Steroid Biochem Molec Biol*(59): 251-60.

Zou, A., Marschke, K.B., Arnold, K.E., Berger, E.M., Fitzgerald, P., Mais, D.E. und Allegretto, E.A. Estrogen receptor beta activates the human retinoic acid receptor alpha-1 promoter in response to tamoxifen and other estrogen receptor antagonists, but not in response to estrogen. *Mol Endocrinol* (1999), 13(3): 418-30.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen und medizinische Fachbegriffe

(A) Abkürzungen

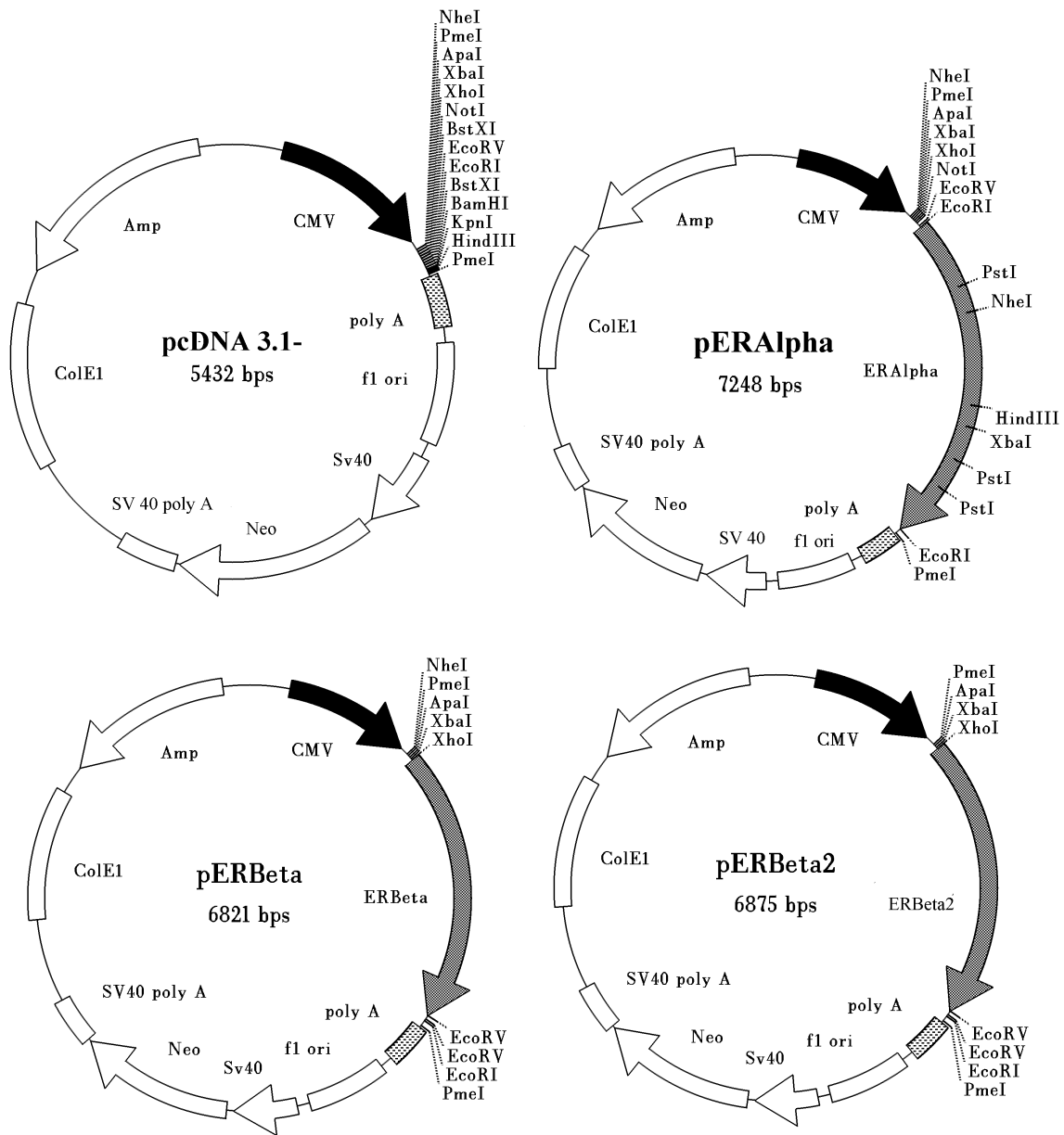
A	Adenosintri-phosphat (in Sequenzen)
AIB1	<i>amplified in breast cancer</i>
AF	Aktivierungsfunktion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
C	Cytidintri-phosphat (in Sequenzen)
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
ddATP	Didesoxyadenosintri-phosphat
ddCTP	Didesoxycytosintri-phosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintri-phosphat
ddTTP	Didesoxythymidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
dNTP	Desoxynucleotidtri-phosphat
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
E2	17- β -Östradiol
ER	Östrogenrezeptor
ERE	<i>Estrogen responsive element</i>
G	Guanosintri-phosphat (in Sequenzen)
HR	Hormonrezeptor
HRT	Hormonersatztherapie
Luc	Luziferase
min	Minuten
N-CoR	<i>nuclear receptor coactivator</i>
OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
P/CAF	<i>P300/CBP associated protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pg	Progesteron

PR	Progesteronrezeptor
RLX	Raloxifen
SA	Standardabweichung
sec	Sekunden
SMRT	<i>silencing mediator for retionid and thyroid hormone receptor</i>
SR	Sterodirezeptor
SRC	<i>steroid receptor coactivator</i> = Sterodirezeptor-Koaktivator
Std.	Stunden
T	Thymidintriphosphat (in Sequenzen)
TAM	Tamoxifen
TBE	TRIS/Borat/EDTA
WT	Widtyp

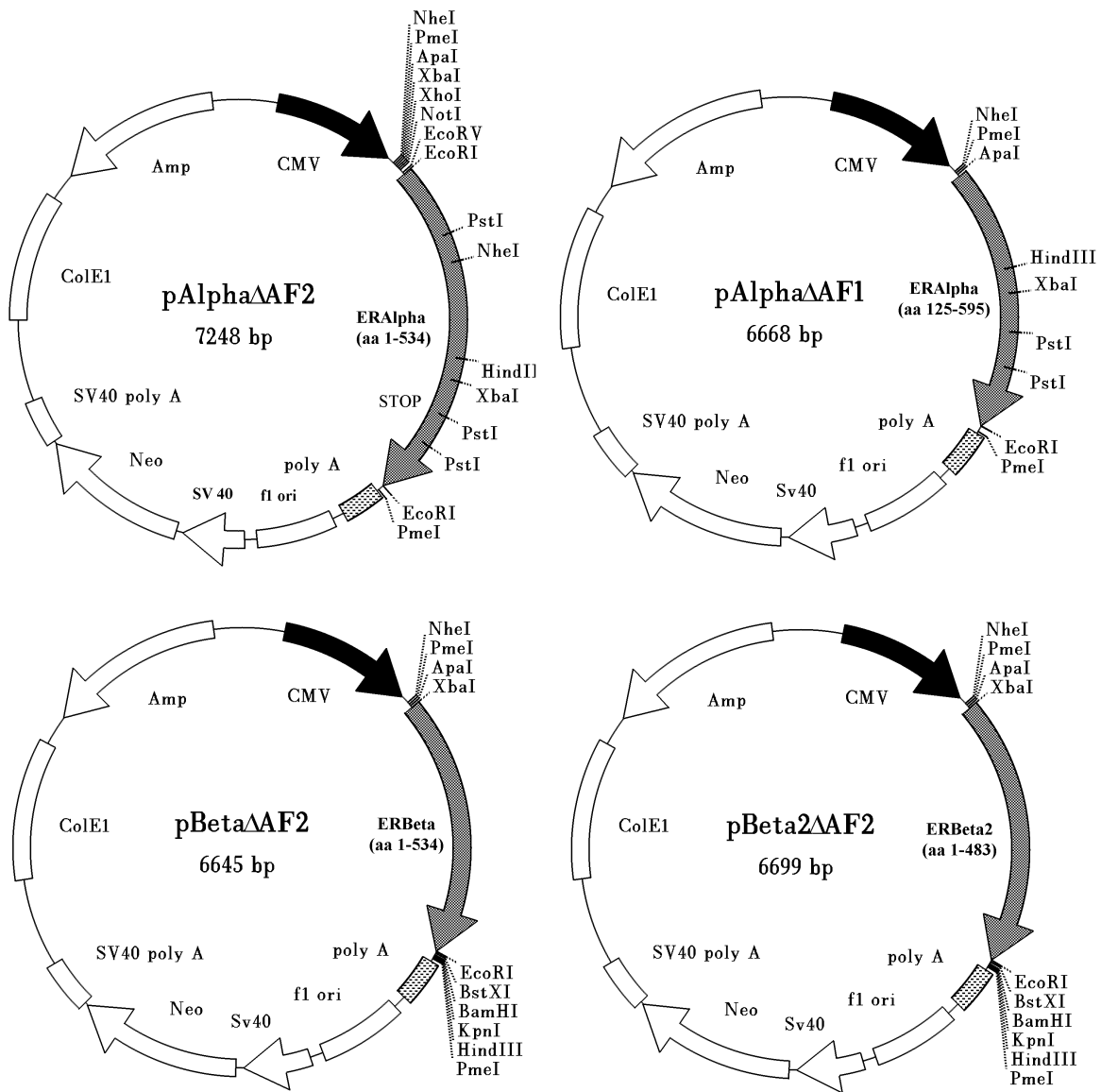
(B) Medizinische Fachbegriffe

Endometrium	Gebärmutterschleimhaut
Hyperplasie	Größenzunahme eines Gewebes
Karzinom	bösartiges Geschwulst epithelialer Herkunft
Mamma	Brust
Neoplasie	Neubildung von Gewebe
Ovar	Eierstock
Ovarektomie	Operative Entfernung der Eierstöcke

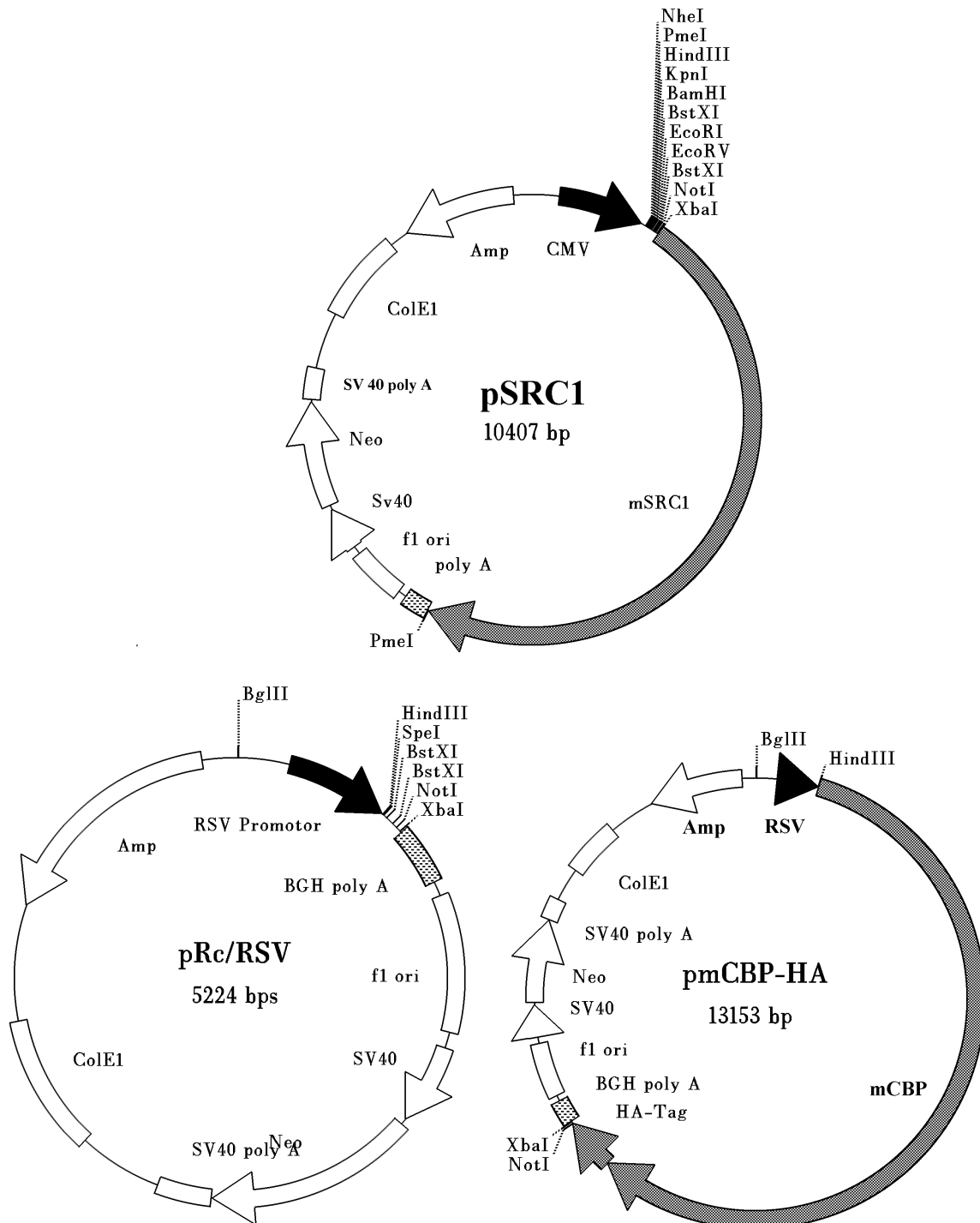
8.2 Plasmide



Expressionsplasmide für die Östrogenrezeptoren ER α , ER β und ER β 2. SV40: SV40 3'untranslated Region; Amp: β -lactamase; ColE1: ColE1 Plasmid-Replikationsursprung; f1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; CMV: CMV-Promotor; Neo: Neomycin-Resistenz; ERAlpha: hER α ; ERBeta: hERBeta.



Expressionsplasmide für Mutanten der Östrogenrezeptoren ER α , ER β und ER β 2. SV40: SV40 3'untranslated Region; Amp: β -lactamase; ColE1: ColE1 Plasmid-Replikationsursprung; f1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; CMV: CMV-Promotor; Neo: Neomycin-Resistenz; ERA α : hER α ; ERBeta: hERBeta.



Expressionsplasmide für ER-Kofaktoren. Amp: β -lactamase; ColE1: ColE1 Plasmid-Replikationsursprung; f1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; RSV: RSV-Promotor; CMV: CMV-Promotor; Neo: Neomycin-Resistenz.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.G. Bender für die Möglichkeit, im molekulargenetischen Labor der Frauenklinik der Universität Düsseldorf arbeiten zu können. Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.

Frau Dr. B. Hanstein und Herrn Dr. D. Niederacher danke ich für die Unterstützung meiner Doktorarbeit sowie für die vielen hilfreichen Ratschläge bei kleinen und großen wissenschaftlichen Problemen.

Meinen Laborkollegen und -kolleginnen danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meiner Kollegin Frau D. Hohmann, die mir bei den Versuchen zur Seite gestanden hat und dabei nie den Humor verloren hat.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt.

Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Weiterhin erkläre ich, daß ich diese in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei noch keiner anderen Fakultät eingereicht habe.