

Aus dem Institut für Anatomie I: Zelluläre Neurobiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktorin Frau Prof. Dr. Gabriele Rune

Intrazelluläre Lokalisation des Östrogenrezeptors beta

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Alexander von Thomsen

aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 28. 01. 2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. U. Wehrenberg

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Rune

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Ch. Bamberger

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	3
1 Abkürzungsverzeichnis	6
2 Fragestellung	11
3 Einleitung	12
3.1 Östrogen und seine Wirkung	12
3.2 Nukleäre Hormonrezeptoren: Ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren	13
3.2.1 Nukleäre Hormonrezeptoren	13
3.2.2 Isoformen	13
3.2.3 Struktur des Östrogenrezeptors beta	14
3.2.4 Genomische Effekte: Regulation der Genexpression durch Östrogenrezeptoren	16
3.3 Schnelle, nicht-genomische Effekte	17
3.4 Die intrazelluläre Lokalisation von Östrogenrezeptoren	17
3.5 Vorkommen nukleärer Östrogenrezeptoren in Zellorganellen und an Zellmembranen	18
3.6 Fluoreszierende Proteine und ihr Einsatz bei der Östrogenrezeptorlokalisierung	20
3.7 Die Sekundärzelllinie PC-12	22
4 Material und Methoden	23
4.1 Material	23
4.1.1 Geräte	23
4.1.2 Software	24
4.1.3 Molekularbiologische Kits	25
4.1.4 Verbrauchsmaterialien	25
4.1.5 Zellen	27
4.1.6 Chemikalien	27
4.1.7 Lösungen	29
4.1.8 Vektoren	32
4.1.9 Primer	36
4.2 Methoden	40
4.2.1 Gießen von LB-Agarplatten	40

4.2.2	Maxiprep (QIAfilter Plasmid Maxi Kit)	40
4.2.3	Photometrische Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung (Ultraspec 3000)	40
4.2.4	Agarosegelelektrophorese	41
4.2.5	Gelextraktion (MinElute Gel Extraction Kit)	41
4.2.6	Klonierung des hER β -Gens	42
4.2.7	Miniprep (QIAprep Miniprep Kit)	46
4.2.8	Einfrieren von Bakterien	47
4.2.9	DNA-Sequenzierung	47
4.2.10	Kollagenbeschichtung	48
4.2.11	Zellkultur	49
4.2.12	Transfektion und Stimulation der PC-12 Zellen	50
4.2.13	RNA-Isolierung aus PC-12 Zellen (RNeasy Mini Kit)	51
4.2.14	RT-PCR	52
4.2.15	Fixierung der PC-12 Zellen	53
4.2.16	Kernfärbung	53
4.2.17	Konventionelle Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	54
4.2.18	Konfokalmikroskopie	55
4.2.19	Morphometrische Analyse und Auswertung der Bilder	55
5	Ergebnisse	57
5.1	Klonierung des hER β -Gens	57
5.1.1	Amplifikation des hER β -Gens	57
5.1.2	Einklonierung von hER β in den Donorvektor	57
5.1.3	Einklonieren von hER β in die Zielvektoren	59
5.2	Expression von hER β in PC-12 Zellen	62
5.2.1	Überprüfung der Expression	62
5.2.2	Fluoreszenzintensität und nukleozytoplasmatische Verteilung	63
5.2.3	Konfokalmikroskopie	75
5.2.4	Schnelle Änderung der Rezeptorlokalisierung	78
6	Diskussion	81
6.1	Klonierung des hER β -Gens	81
6.2	Expression von fluoreszierenden hER β -Fusionsproteinen in PC-12 Zellen	82
6.2.1	Überprüfung der Expression	82
6.2.2	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit	83

6.2.3	Östrogenwirkung auf die Fluoreszenzintensität	83
6.2.4	Nukleozytoplasmatische Verteilung der Fusionsproteine	83
6.2.5	Lokalisation der unstimulierten hER β -Fusionsproteine	85
6.2.6	Veränderung der intrazellulären Verteilung mit der Zeit	86
6.2.7	Veränderung der intrazellulären Verteilung durch Östradiol	86
6.2.8	Gibt es Östrogenrezeptoren an der Plasmamembran?	88
7	Zusammenfassung	92
8	Literaturverzeichnis	93
9	Danksagung	103
10	Lebenslauf	104
11	Eidesstattliche Versicherung	105

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AF	Transaktivierungsfunktion
ATCC	American Type Culture Collection
att	Attachment Site
bp	Basenpaare
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
CI	Confidence Interval (Konfidenzintervall)
CLM	Caveolar-Like Microdomains (Caveolar-ähnliche Mikrodomänen)
CMV	Cytomegaly Virus (Zytomegalievirus)
COS-1	Chinese Hamster Ovary Cells 1 (Ovarzellen des Chinesischen Hamsters)
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
Da	Dalton
DAPI	2-(4-carbamimidoylphenyl)-1H-indol-6-carboximidamid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DBD	DNA-bindende Domäne
D-Box	distale Box
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat

dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
E2	17 β -Östradiol
E. coli	Escherichia coli
ECFP	Enhanced Cyan Fluorescent Protein
EDAS	Electrophoresis Documentation And Analysis System
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Estrogen Receptor (Östrogenrezeptor)
ERE	Estrogen Response Element
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase
ERR	Oestrogen-Related Receptor
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)

GFP	Green Fluorescent Protein
GPR30	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30
hER	humaner Östrogenrezeptor
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockprotein)
IGF	Insulin-Like Growth Factor (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kbp	Kilobasenpaare
LB	Lysogeny Broth
LBD	Ligandenbindende Domäne
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NGF	Nerve Growth Factor (Nervenwachstumsfaktor)
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
(e)NOS	(endotheliale) Stickstoffmonoxid-Synthase
NR	nukleärer Rezeptor
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
ori	Origin of Replication
P-Box	proximale Box
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PC-12	Phäochromozytom 12

PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Poly A	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RE	Response Element
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)
SRA	Steroid Receptor RNA Activator
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
ssDNA	Single Strand Deoxyribonucleic Acid (Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	ultraviolette Strahlung

Zn

Zink

ZNS

Zentralnervensystem

2 FRAGESTELLUNG

In den letzten vier Jahrzehnten wurde die Wirkung und der Mechanismus nukleärer Rezeptoren, wie z. B. dem Östrogenrezeptor, ausführlich untersucht. Kurz zusammengefasst besteht die Genaktivierung durch Östrogenrezeptoren aus der Translokation des Rezeptors nach Hormonzugabe in den Zellkern (Jensen et al. 1968, Schlegel et al. 1999) und der nachfolgenden Aktivierung der Transkription des Zielgens (Beato und Klug 2000). Aber auch eine intranukleäre Redistribution ohne Veränderung der nukleozytoplasmatischen Verteilung ist beschrieben worden (Htun et al. 1999, Stenoien et al. 2000, Matsuda et al. 2002, Maruvada et al. 2003, Ochiai et al. 2004, Jankevics et al. 2005). All diese Funktionen des Östrogenrezeptors fasst man unter dem Begriff genomische Effekte zusammen, und diese wurden sowohl für den seit langem bekannten Östrogenrezeptor α als auch für den seit kürzerem bekannten Östrogenrezeptor β beschrieben. Darüber hinaus legen jedoch so genannte schnelle, nicht-genomische Effekte eine Funktion von Östrogenrezeptoren nahe, die über ihre Aufgabe als nukleäre Transkriptionsfaktoren hinausgeht und auf die Beteiligung an Signalwegen außerhalb des Zellkernes hindeutet (Linford et al. 2000). Dies führt zusammen mit der Beobachtung, dass die Aktivierung von Östrogenrezeptoren durch membranimpermeable Hormone möglich ist, zu der Annahme membranständiger Östrogenrezeptoren (Razandi et al. 1999). Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben östrogenbindende Proteine an der Zellmembran. Die Ergebnisse stützen sich hierbei auf die Detektion von Rezeptoren in Membranfraktionen von Zellen (Lu et al. 2002, Razandi et al. 2002, Nishio et al. 2004) sowie auf den immunhistologischen Nachweis von Östrogenrezeptoren an Membranen (Pappas et al. 1995, Lu et al. 2002, Milner et al. 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Lokalisation des humanen Östrogenrezeptors beta in der neuronalen Zelllinie PC-12 in Abhängigkeit von der Stimulation mit 17β -Östradiol. Insbesondere sollte an lebenden Zellen untersucht werden, ob der Östrogenrezeptor β (ER β) an der Zellmembran angesiedelt ist, bzw. ob die Hormonstimulation zur Translokation an die Zellmembran führt, da es hierfür Hinweise in der Literatur gibt (Razandi et al. 1999). Hierzu wurde hER β mittels fluoreszierender Proteine N- und C-terminal markiert. Dies geschah in der Annahme eines möglichen Einflusses der Fusionsreihenfolge auf die Lokalisation.

3 EINLEITUNG

3.1 Östrogen und seine Wirkung

Östrogene sind Steroidhormone mit vielfältigen Wirkungen auf verschiedene Organsysteme. Das Östrogen mit der höchsten biologischen Prävalenz und Potenz ist 17β -Östradiol (E₂; Singh et al. 2006). Als Sexualhormon im klassischen Sinne beeinflusst Östradiol Fortpflanzungsfunktionen und das Wachstum reproduktiver Organe wie Uterus, Ovar und Mamma (Smith 1998).

Außer der Wirkung von Östrogenen auf reproduktive Systeme sind jedoch auch Effekte auf andere Organsysteme bekannt. So werden Östrogenen positive Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System nachgesagt. Östrogen schützt das Endothel vor Verletzungen und hat darüber hinaus antiatherosklerotische Wirkungen. Über eine Erhöhung der Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) und die Regulation von Kaliumkanälen ist eine Regulation von Endothelfunktion und Vasotonus möglich (Simoncini und Genazzani 2000). Im Knochen ist Östrogen bedeutend für die Homöostase. Das Steroidhormon fördert Knochenaufbau und Kollagensynthese (Deroo und Korach 2006).

Seit einigen Jahren rückt aber vor allem die Bedeutung von Östrogen für das ZNS in den Fokus der Untersuchungen. So konnte gezeigt werden, dass Östrogen nicht nur in „klassisch“ östrogensensitiven, reproduktiven Organen wie Ovar und Uterus synthetisiert wird, sondern dass es auch eine vollständige Steroidsynthese im ZNS gibt. In Hinblick auf Östrogen konnte die de-Novo-Synthese im Gehirn nachgewiesen werden (Prange-Kiel et al. 2003). Die Hormone beeinflussen die Neurogenese, synaptische Plastizität und den Metabolismus von Neurotransmittern (McEwen 2001). Östrogene nehmen Aufgaben im Bereich der sexuellen Differenzierung, aber auch in Kognition, Gedächtnis und Affektivität, sowie Motorik und vegetativen Funktionen wahr (Linford et al. 2000). Bei zahlreichen zentralnervösen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Parkinson-Syndromen und affektiven Störungen gibt es Hinweise auf einen protektiven Effekt von Östrogenen. Sie scheinen auch eine wichtige protektive Funktion beim ischämischen Insult zu spielen (Garcia-Segura et al. 2001).

3.2 Nukleäre Hormonrezeptoren: Ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren

3.2.1 Nukleäre Hormonrezeptoren

Östrogenrezeptoren gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Diese umfasst nach dem heutigen Wissensstand über 60 bekannte Proteine, darunter Rezeptoren für Östrogene, Androgene, Gluco- und Mineralokortikoide, Progesterone, Schilddrüsenhormone, Retinoid und Vitamin D. Darüber hinaus existiert eine Reihe von homologen Proteinen, für welche kein Ligand existiert bzw. bekannt ist. Diese Moleküle werden im Englischen als Orphan Receptors, also „Rezeptorweisen“ bezeichnet. Beispiele für solche Eiweiße sind die Oestrogen-Related Receptors (ERR; Beato und Klug 2000).

Allen nukleären Rezeptoren gemeinsam ist der Weg der Transaktivierung von Genen. Die Rezeptoren liegen in inaktiver Form vor. Durch Bindung von Liganden werden sie in die aktive Form überführt. Für die meisten Rezeptoren wird hierdurch gleichzeitig ein Kerntransportsignal (nukleäres Lokalisationssignal, NLS) aktiviert, welches zur Translokation des Rezeptors in den Zellkern führt. Gleichzeitig wird eine DNA-bindende Domäne (DBD) entfaltet, die zur Bindung des nukleären Rezeptors an sein entsprechendes Response Element (RE) benötigt wird. Nukleäre Rezeptoren können sowohl eine Stimulation (engl. Enhancement) als auch eine Hemmung der Transkription (engl. Silencing) bewirken (Tsai und O'Malley 1994, Beato und Klug 2000).

3.2.2 Isoformen

Wie für viele Proteine sind auch für die Östrogenrezeptoren (Unterfamilie NR3A) eine Vielzahl von strukturverwandten Proteinen mit einem hohen Grad an Homologie der Aminosäuresequenz bekannt. Das zunächst entdeckte Molekül (Walter et al. 1985) wurde zunächst als Östrogenrezeptor (ER) bezeichnet. Nach der Klonierung eines zweiten Östrogenrezeptors wurde jenes dann in Östrogenrezeptor alpha ($ER\alpha$) umbenannt. Das neu entdeckte Molekül bekam den Namen Östrogenrezeptor beta ($ER\beta$; Kuiper et al. 1996, Mosselman et al. 1996, Tremblay et al. 1997). Die beiden Rezeptoren werden auch entsprechend den Empfehlungen des Nuclear Receptors Nomenclature Committee als

NR3A1 (ER α) und NR3A2 (ER β) bezeichnet (Beato und Klug 2000). Vor kurzem wurde die Rezeptorgruppe um den Östrogenrezeptor gamma (ER γ ; Hawkins et al. 2000) erweitert.

Östrogenrezeptoren finden sich in diversen Geweben, wobei eine unterschiedliche Verteilung der Isoformen gefunden wurde. Besonders hohe Konzentrationen an ER α weisen Nieren, Nebenhoden und Nebennieren auf. ER β ist stark in Prostata, Lunge und Blase angereichert. In Uterus, Ovar und Hoden zeigten sich große Mengen sowohl an ER α als auch an ER β (McEwen 2001). ER γ wurde in Reproduktionsorganen und ZNS von *Micropogonias undulatus* gefunden (Hawkins et al. 2000). Neben den genannten Geweben richtete sich das Augenmerk in den letzten Jahren auf Steroidrezeptoren im ZNS. Hypophyse, Hypothalamus und Amygdala weisen hohe Konzentrationen der alpha-Isoform auf (McEwen 2001). Doch auch ER β lässt sich im Gehirn nachweisen (McEwen 2001, Mitra et al. 2003). Im Neokortex findet sich eine lebenslange Expression von ER β , wohingegen ER α nur während der Entwicklung in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden kann (Toran-Allerand 2004). Ein weiteres Gebiet des ZNS mit nennenswerten Konzentrationen an Östrogenrezeptoren stellt der Hippocampus dar. Hier konnten ER α und ER β (Rune et al. 2002, Prange-Kiel et al. 2003) sowie Hinweise auf Ihre Rolle in Synaptogenese und synaptischer Plastizität gefunden werden (McEwen 2001, Rune et al. 2002). Hierdurch ist eine Modulation von kognitiven und affektiven Funktionen sowie Gedächtnis möglich (McEwen 2001).

3.2.3 Struktur des Östrogenrezeptors beta

In der vorliegenden Arbeit wurde der humane Östrogenrezeptor beta untersucht. Bei diesem handelt es sich um ein aus 530 Aminosäuren aufgebautes Protein. Die zu Grunde liegende klonierte cDNA hat eine Länge von 1740 bp. In der Nukleotidsequenz finden sich drei Startcodons (Basentriplett ATG) an den Positionen 99, 234 und 258. Das Open Reading Frame (ORF) umfasst 1590 bp. Dies ergibt ein berechnetes Molekulargewicht von 59,2 kDa für das Protein. Durch In-vitro-Transkription ließen sich Moleküle von 57 und 60 kDa erzeugen. Ein Transkript von 7,5 kbp konnte nachgewiesen werden (Ogawa et al. 1998).

Der oben beschriebene Weg der Transaktivierung setzt entsprechende Strukturmerkmale der Östrogenrezeptoren voraus. Steroidrezeptoren müssen Liganden binden und anschließend

zum Ort der Transkription geleitet werden, wo sie durch Interaktion mit DNA und der Transkriptionsmaschinerie oder Cofaktoren in die Regulation der Genexpression eingreifen. Die hierzu benötigten Funktionen sind in den Rezeptoren modular in Form so genannter Domänen organisiert. Diese Struktur ist exemplarisch für ER β in Abb. 1 dargestellt.

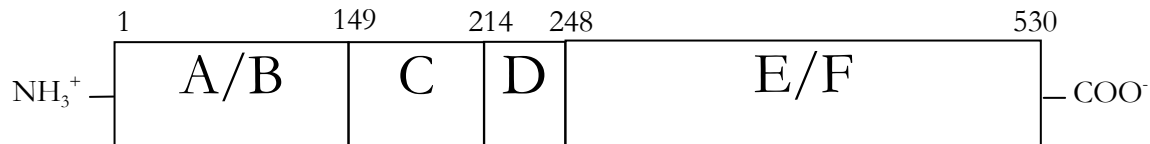


Abb. 1: Struktur von hER β : N-terminal liegt die A/B-Domäne, welche die Transaktivierungsfunktion 1 (AF-1) enthält. An die A/B-Domäne schließen sich die DNA-bindende Domäne C und die Scharnierregion D an. Am C-Terminus des Rezeptors liegt die ligandenbindende E-Domäne inklusive AF-2 und die F-Domäne. Zahlen bezeichnen Aminosäuren (modifiziert nach Ogawa et al. 1998).

Am amino-terminalen Ende des Östrogenrezeptors beta befinden sich die A- und B-Domänen, welche zu einer funktionellen A/B-Domäne zusammengefasst werden. Diese enthält eine Transaktivierungsfunktion (AF-1), erfüllt also eine Aufgabe bei der Aktivierung der Genexpression (Tsai und O'Malley 1994, Beato und Klug 2000). Die C/D-Domäne wird auch als DNA-bindende Domäne (DBD) bezeichnet. Sie stellt den Abschnitt des Rezeptormoleküls dar, der zur DNA-Bindung benötigt wird. Hierfür sind zwei Typ II-Zinkfinger vorhanden. Bei diesen handelt es sich um Abschnitte, in denen zwei Cysteinpaare ein Zn-Atom komplexieren. Der erste Zinkfinger beinhaltet die sogenannte P-Box, eine Sequenz von wenigen Aminosäuren, die der sequenzspezifischen Bindung an Östrogen Response Elements (ERE) der DNA dient. Am zweiten Zinkfinger befindet sich die D-Box. Es handelt sich bei dieser um ein schwaches Dimerisierungssignal (Tsai und O'Malley 1994, Beato und Klug 2000). Die DBD von ER α und ER β sind zu ca. 96% homolog (Ogawa et al. 1998). P- und D-Box sind in beiden Molekülen identisch (Kuiper et al. 1996). In der C/D-Domäne sind darüber hinaus drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) enthalten. Dies bewirkt eine Anreicherung der Rezeptoren im Zellkern (Ylikomi et al. 1992).

Die am Carboxyterminus des Östrogenrezeptors befindliche E-Domäne ist die Ligandenbindende Domäne (LBD). Sie besteht aus 12 α -Helices (H1-H12). Der Ligand wird über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. Je nachdem, ob es sich beim Liganden um einen Agonisten oder Antagonisten handelt, wird eine andere Konformation eingenommen und die Helix H12 in verschiedener Ausrichtung

über der aus den übrigen Helices gebildeten Höhle ausgerichtet. Dies beeinflusst die Exposition der zweiten Transaktivierungsfunktion AF-2, deren Kern sich in H12 befindet. Die korrekte Ausrichtung von H12 ist wichtig für die Interaktion des Östrogenrezeptors mit Coaktivatoren bei der Regulation der Transkription. Neben der Bindung von Liganden und Coaktivatoren erfüllt die E-Domäne den Zweck einer ligandenabhängigen Dimerisierungsfunktion (Pike et al. 2000). Die LBD von ER β ist zu 53% homolog zu der von ER α (Ogawa et al. 1998). Für ER α ist ein ligandeninduzierbares nukleäres Lokalisationssignal beschrieben (Ylikomi et al. 1992).

Für die F-Domäne ist beim Östrogenrezeptor keine Funktion bekannt (Tsai und O'Malley 1994).

3.2.4 Genomische Effekte: Regulation der Genexpression durch Östrogenrezeptoren

Über Jahrzehnte galt die einstimmige Lehrmeinung, dass Östrogenrezeptoren, wie alle nukleären Rezeptoren, ausschließlich über sogenannte genomische Effekte wirken können. Hierbei liegen die Östrogenrezeptoren im inaktiven, ligandenungebundenen Zustand als Monomere in Komplexen mit Hitzeschockproteinen (engl. Heat Shock Proteins = HSP) in der Zelle vor (Tsai und O'Malley 1994, Beato und Klug 2000, McDonnell und Norris 2002). Nach Bindung des Liganden an die LBD des Rezeptormoleküls kommt es zur Dissoziation der Hitzeschockproteine und einer Konformationsänderung des Rezeptors (Beato und Klug 2000), woraufhin ER α und ER β Homo- oder Heterodimere bilden (Pike et al. 2000).

Die Dimerisierung der Östrogenrezeptoren ermöglicht nun eine Bindung an Estrogen Response Elements (ERE) der DNA. Bei diesen handelt es sich um Palindrome, die die spezifische Bindung der Östrogenrezeptoren über die P-Box der DBD ermöglichen (Tsai und O'Malley 1994, Beato und Klug 2000). Die Interaktion von Östrogenrezeptor und seinem ERE hat im weiteren Verlauf eine Aktivierung (Enhancement) oder Hemmung (Silencing) der Transkription zur Folge. Hierbei spielen Cofaktoren eine Rolle. Diese vermitteln die Interaktion mit weiteren Cofaktoren oder der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie. Bei den Cofaktoren kann es sich um Aktivatoren oder Repressoren handeln. Unter den Coaktivatoren sind solche, die mit der Transaktivierungsfunktion AF-1 der A/B-Domäne des Östrogenrezeptors interagieren, wie

z. B. der Steroid Receptor RNA Activator (SRA), und solche, die an die AF-2 Funktion der LBD binden, wie z. B. Moleküle der p160-Familie (McDonnell und Norris 2002).

3.3 Schnelle, nicht-genomische Effekte

Neben dem im vorherigen Abschnitt geschilderten Bild der Östrogenrezeptoren als nukleäre, ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, also Regulatoren der Genexpression häufen sich in den letzten Jahren Belege für nicht-genomische Effekte. Diese unterscheidet von den genomischen Effekten die Tatsache, dass sie sich im Rahmen von Minuten ereignen und daher nicht auf eine genregulatorische Antwort zurückzuführen sind (Toran-Allerand 2004). Es wurden unterschiedliche Punkte in Second-Messenger-Signalwegen beschrieben, an denen Östrogen regulierend eingreift. So wurde eine östrogen-induzierte Aktivierung von G-Proteinen (Razandi et al. 1999, Wyckoff et al. 2001, Simoncini et al. 2006), des cAMP-PKA-CREB-Signaltransduktionsweges (Linford et al. 2000), des Phospholipase C/Proteinkinase C/Inositol-1,4,5-triphosphat-Weges (PLC/PKC/IP₃; Marino et al. 1998, Razandi et al. 1999, Razandi et al. 2003b, Boulware et al. 2005) und von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK, Migliaccio et al. 1996, Razandi et al. 1999) nachgewiesen. Viele dieser Effekte wurden u. a. mit neuroprotektiven Wirkungen von Östrogen in Verbindung gebracht (Linford et al. 2000).

Diese Vielzahl von Östrogeneffekten lässt zunächst ein unübersichtliches Bild der nicht-genomischen Effekte entstehen. Gemeinsam ist jedoch allen, dass sie nicht auf der Transaktivierung eines Gens beruhen, sondern auf der Beeinflussung von Second-Messenger-Systemen. Dies widerspricht dem „klassischen“ Mechanismus eines nukleären Rezeptors.

3.4 Die intrazelluläre Lokalisation von Östrogenrezeptoren

Wie bereits weiter oben erläutert, lautet das Dogma der Genaktivierung durch nukleäre Rezeptoren wie z. B. dem Östrogenrezeptor, dass nach Bindung und Aktivierung durch den Liganden die Östrogenrezeptoren an DNA-Abschnitte binden und hierdurch die Genexpression modulieren (Tsai und O'Malley 1994). Über die Lokalisation vor und nach der Hormonbindung sind jedoch in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Thesen

vertreten worden. Ursprünglich wurde ein Zwei-Schritt-Modell der Rezeptoraktivierung vorgeschlagen. Dieses deutete die Vorgänge als Bindung des Liganden an den Rezeptor im Zytoplasma mit konsekutiver Translokation von Rezeptoren in den Zellkern (Jensen et al. 1968). Dem widersprachen jedoch immunhistochemische Lokalisationsversuche, welche die Proteine auch im ligandenungebundenen Zustand im Zellkern zeigten (King und Greene 1984, Welshons et al. 1984). In anderen Studien wurden gleichzeitig nukleäre und zytoplasmatische Lokalisationen der Rezeptoren, und zwar sowohl für ER α (Blaustein et al. 1992, Prange-Kiel et al. 2003, Kalita et al. 2005) als auch für ER β (Mitra et al. 2003, Prange-Kiel et al. 2003, Kalita et al. 2005), beobachtet. Östrogen bewirkt im Hippocampus eine Zunahme der nukleären Färbung für ER α , jedoch eine reduzierte Färbung des Zellkerns für ER β (Prange-Kiel et al. 2003).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass ER α einem nukleozytoplasmatischen Shuttling unterliegt. Hierbei handelt es sich um eine stetige Wanderung von Rezeptoren zwischen Zellkern und Zytoplasma. Die Aufnahme der Rezeptoren in den Zellkern ist energieabhängig. Die Stimulation mit Östradiol bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichtes in den Zellkern (Dauvois et al. 1993). Die Lokalisation der östrogenbindenden Rezeptoren ist dem zu Folge hoch dynamisch. Hinsichtlich des Verhaltens der Rezeptoren im Zellkern konnte festgestellt werden, dass gebundene und ungebundene Östrogenrezeptoren alpha kontinuierlich über einem östrogen-responsiven Promoter kreisen. Diese proteasomenabhängige Wanderung erfolgt rascher bei ungebundenen Rezeptoren (Reid et al. 2003).

3.5 Vorkommen nukleärer Östrogenrezeptoren in Zellorganellen und an Zellmembranen

Zunächst wurden die in Kapitel 3.3 beschriebenen schnellen, nicht-genomischen Effekte von Östrogen natürlich als völlig unabhängig von den nukleären ER α und ER β gesehen. Als Kernrezeptoren weisen sie schließlich DNA-bindende Abschnitte auf, führen zu einer erhöhten Transkription und besitzen vor allem weder eine bekannte Membranlokalisierungsdomäne, noch Strukturen, die sie zur Bindung von G-Proteinen befähigen.

Auch das Vorfinden von ER α und ER β in Mitochondrien (Monje und Boland 2001, Cammarata et al. 2004, Chen et al. 2004a, Yang et al. 2004, Milner et al. 2005) passt in das Schema von Kernrezeptoren, denn in diesen Organellen aktivieren die Rezeptoren mitochondriale Gene (Chen et al. 2004b). Erstaunlich war aber, dass man ER α und ER β in Zellorganellen wie Endoplasmatischem Retikulum (Blaustein et al 1992, Monje und Boland 2001, Milner et al. 2005), Lysosomen (Qualmann et al. 2000) und synaptischen Vesikeln (Blaustein et al. 1992, Adams et al. 2002, Milner et al. 2005) fand. Diese Strukturen weisen keine DNA auf, sind aber alle von einer Membran umgeben. Die Assoziation von ER α und ER β mit Membranen wurde ebenfalls durch den Einsatz von nicht-membranpermeablen Östrogenen und der Hemmbarkeit der nicht-genomischen Effekte von Östrogen durch Rezeptorantagonisten gestärkt (Razandi et al. 1999). Bereits 1977 wurden in Bindungsstudien an Endometriumzellen membranständige Bindungsstellen für Östrogen entdeckt (Pietras und Szego 1977). In den letzten Jahren häufen sich Berichte über membran-assoziierte nukleäre Östrogenrezeptoren. Immunhistochemisch wurde ER α an Membranen einer Vielzahl von Zellen gefunden (Pappas et al. 1995, Clarke et al. 2000, Adams et al. 2002, Lu et al. 2002, Razandi et al. 2002, Song et al. 2004, Acconcia et al. 2005, Pawlak et al. 2005, Ropero et al. 2006). Außerdem konnte ER α in Membranfraktionen von Gefäßwandmuskelzellen (Lu et al. 2002) und Myokardiozyten (Ropero et al. 2006) nachgewiesen werden, und auch ER β fand sich in Membranfraktionen aus murinem Hippocampus (Nishio et al. 2004). Elektronenmikroskopisch wurden Rezeptoren in Zellmembranen von hippocampalen Zellen dargestellt (Milner et al. 2005). In Gefäßmuskel- und MCF-7-Zellen wurde ER α in Membranfraktionen gefunden. Hierbei wurde eine Assoziation des Rezeptors mit Caveolin-1 und -2 festgestellt. Desweiteren führten Caveolinexpression und Östradiolstimulation zu einer Translokation von zytoplasmatischem ER α an die Zellmembran (Razandi et al. 2002). In der E-Domäne wurde eine Signalfunktion für den Transport von ER α zur Zellmembran erkannt. Eine Mutation in der Domäne führte zu einer verringerten Colokalisation mit Caveolin-1, sowie zu einem Absinken der Signaltransduktion von ERK, cAMP und Inositoltriphosphat. In diesem Zusammenhang wurden Östrogenrezeptoren im unstimulierten Zustand an der Membran lokalisiert (Razandi et al. 2003a).

Neben den Studien, welche membranständige Proteine in Form der bekannten Isoformen ER α und ER β postulieren, häufen sich Veröffentlichungen, die von neuen, von den bekannten Rezeptoren verschiedenen, Molekülen ausgehen. So brachte eine Arbeitsgruppe

Belege für ein als Östrogenrezeptor X (ER-X) bezeichnetes Protein hervor. Dieses östrogenbindende Molekül zeigte im Neokortex von 7 Tage alten ER α -knock-out Mäusen Immunreaktivität für Antikörper, die gegen die LBD von ER α gerichtet waren. Jedoch betrug das Molekulargewicht nur 62-63 kDa. ER-X wurde in Caveolar-ähnlichen Mikrodomänen (engl. Caveolar-Like Microdomains=CLM) lokalisiert (Toran-Allerand et al. 2002). Auch der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 30 (GPR30) wurde als östrogenbindendes Zellmembranprotein identifiziert (Funakoshi et al. 2006).

3.6 Fluoreszierende Proteine und ihr Einsatz bei der Östrogenrezeptorlokalisierung

In dieser Arbeit wird die intrazelluläre Verteilung des humanen Östrogenrezeptors β mit Hilfe eines Fusionsproteins, bestehend aus dem hER β und einem fluoreszierenden Protein, untersucht. Die erstellten Fusionsproteine wurden mittels Expressionsvektoren in Zellen einer neurogenen Sekundärzelllinie (PC-12) transfiziert. Besonderes Augenmerk lag auf der Fragestellung, ob der Kernrezeptor hER β tatsächlich in einer membrangebundenen Form vorliegt.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Proteinen handelt es sich um zwei Varianten des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), nämlich das Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) und das Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP). Diese beiden Moleküle wiesen in Studien mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine größtenteils eine korrekte Lokalisation auf, wobei die Fusionsart im Protein eine Rolle spielte (Simpson et al. 2000).

Bereits in anderen Studien wurden fluoreszierende Proteine zur Lokalisation von Östrogenrezeptoren verwendet. Die Funktionstüchtigkeit der Fusionsproteine als nukleäre Transkriptionsfaktoren wurde hierbei bestätigt. Sowohl N-terminal mit EGFP (Stenoien et al. 2000, Matsuda et al. 2002, Maruvada et al. 2003, Xu et al. 2003), ECFP (Matsuda et al. 2002, Ochiai et al. 2004) oder EYFP (Matsuda et al. 2002) fusionierter ER α wie auch die C-terminal mit EGFP markierten Varianten (Xu et al. 2003) waren in der Lage, Reportergene, die Estrogen Response Elements (ERE) enthalten, zu aktivieren. Gleiches gilt für N-terminal mit EGFP oder ECFP fusionierten ER β (Matsuda et al. 2002).

In Lokalisationsstudien wurde ER α , welcher am N-Terminus mit einem fluoreszierenden Protein markiert worden war, in verschiedenen Zelllinien fast ausschließlich im Zellkern beobachtet. Die Stimulation mit Östrogen bewirkte eine intranukleäre Redistribution von einer homogenen Verteilung zu einem punktierten Muster (Htun et al. 1999, Stenoien et al. 2000, Matsuda et al. 2002, Maruvada et al. 2003, Ochiai et al. 2004, Jankevics et al. 2005). Für N-terminal mit EGFP markierten ER β zeigte sich die gleiche nukleäre Lokalisation und Redistribution (Matsuda et al. 2002). Auch die C-terminale Fluoreszenzmarkierung von ER α mit EGFP zeigte die gleiche Redistribution wie die N-terminale (Pasqualini et al. 2001).

Hinsichtlich einer möglichen stärkeren Bindung an die nukleäre Matrix nach Östrogenstimulation gibt es divergente Ergebnisse (Htun et al. 1999, Stenoien et al. 2000, Reid et al. 2003). In einer Studie konnte eine hohe intranukleäre Mobilität von EGFP-hER α aufgezeigt werden, welche durch die Behandlung der Zellen mit Östrogen reduziert wurde (Reid et al. 2003).

Die oben beschriebenen Experimente zeigten, wie für Kernrezeptoren zu erwarten, eine nukleäre Lokalisation von Östrogenrezeptoren. Andererseits weisen Untersuchungen an kortikalen Neuronen der Maus auf eine direkte posttranslationelle Translokation von EGFP-ER α bzw. ER α -EGFP in Neuriten hin. Östrogen verminderte die Akkumulation neu synthetisierter Rezeptoren in den Fortsätzen, führte aber zu keiner Relokalisation von Östrogenrezeptoren, die bereits vor Östrogenstimulation in Neuriten lokalisiert waren (Xu et al. 2003). In einer anderen Arbeit konnte EGFP-gekoppelter ER α an der Zellmembran lokalisiert werden. Hierbei wurde die E-Domäne als entscheidender Faktor von Membranlokalisation und Caveolinbindung bewertet (Razandi et al. 2003a). Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb eine Verlagerung von membran-assoziierten, extranukleären EGFP-ER α in den Zellkern. Diese Translokation wurde durch Östrogen, fetales Rinderserum (FBS) oder EGF hervorgerufen. Unstimuliert waren sowohl extranukleäre Östrogenrezeptoren als auch Moleküle im Zellkern gesehen worden (Lu et al. 2002). Untersuchungen verschiedener Isoformen von ER α zeigten eine nukleäre, zytoplasmatische oder gemischt nukleozytoplasmatische Verteilung von ER α -EGFP. Die Stimulation bewirkte je nach Isoform entweder eine intranukleäre Redistribution oder hatte keinen sichtbaren Effekt (Pasqualini et al. 2001).

3.7 Die Sekundärzelllinie PC-12

Die Sekundärzelllinie PC-12 wurde aus einem Phäochromozytom der Ratte entwickelt. Es handelt sich folglich um neuroendokrine Zellen. Diese besitzen den Karyotyp 40,XY. Nach Zugabe von NGF beginnen die Zellen, neuronale Fortsätze auszubilden (Greene und Tischler 1976).

Kontrovers wird die Expression von Östrogenrezeptoren in PC-12 Zellen gesehen. Während manche Arbeitsgruppen Östrogenrezeptoren nachweisen konnten (Sohrabji et al. 1994, Nilsen et al. 1998, Alexaki et al. 2004, Koski et al. 2004, Lee et al. 2004, Maharjan et al. 2005) ergaben andere Untersuchungen das Fehlen einer Östrogenrezeptorexpression (Lustig et al. 1994, Merot et al. 2005). In mit ER α -transfizierten PC-12 Zellen wurde eine Verstärkung des NGF-induzierten Neuritenwachstums sowie neuroprotektive Effekte (Merot et al. 2005) durch Östrogen festgestellt. Antiapoptotische Wirkungen von Östradiol waren in nativen PC-12 Zellen zu beobachten (Alexaki et al. 2004, Koski et al. 2004). Diese wurden plasmamembran-assoziierten Östrogenrezeptoren zugeschrieben (Alexaki et al. 2004).

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

- Abzug Variolab Mobilien W90 Waldner, Deutschland
- Bakterienbrutschrank Typ 206 Melag, Deutschland
- CO₂-Brutschrank für Zellkultur CB150 WTB Binder, Deutschland
- Electrophoresis Documentation And Analysis System (EDAS) 120 Kodak, USA
- Gelelektrophoresestromquelle E321/331 Consort, Belgien
- Gelelektrophoresesystem Easy-cast B1A Owl Scientific, USA
- Hämozytometer nach Neubauer, 0,0025 mm² x 0,1 mm Marienfeld, Deutschland
- Heizblock VLM 2Q VLM, Deutschland
- Inkubator/Schüttler TH30 Edmund Bühler, Deutschland
- Kamera AxioCam HRc Zeiss, Deutschland
- Kolbenhubpipetten Pipetman P Gilson, Frankreich

- Magnetrührer MR 3001 Heidolph Instruments, Deutschland
- Mikroskop Axiovert 25/100/200M Zeiss, Deutschland
- pH Meter MP 220 Mettler-Toledo, Schweiz
- Pipettierhilfe accu-jet Brand, Deutschland
- Schüttelwasserbad 1086 Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland
- Sterile Arbeitsbank Klasse 2 Hera Safe HS15 Kendro, Deutschland
- Thermocycler Mastercycler Gradient Eppendorf, Deutschland
- UV-Lampe mbq 52 ac Leitungselektronik, Deutschland
- UV-Tisch Tfx-20M Vilber Lourmat, Frankreich
- UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 3000 GE Healthcare, UK
- Vortex-Genie 2 G560E Scientific Industries, USA
- Waage BP 301 s Sartorius, Deutschland
- Zentrifuge Universal 32R Hettich, Deutschland

4.1.2 *Software*

- Axiovision Version 3.1 Zeiss, Deutschland
- Blast2 Sequences Version Blastn National Library of Medicine,

- Falcon Kulturplatten multiwell 24 Well Becton, Dickinson and Company, USA
- Falcon Pipetten 5 ml/10 ml/25 ml Becton, Dickinson and Company, USA
- Falcon Zellkulturschalen 100 x 20 mm Becton, Dickinson and Company, USA
- Falcon Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml Becton, Dickinson and Company, USA
- Kulturflaschen Nunclon Δ Oberfläche mit Filterkappe,
schräger Hals, Kulturoberfläche 80 cm² Nunc, Dänemark
- Lab-Tek II Chamber Slides- CC2 Nunc, Dänemark
- Parafilm M Pechiney Plastic Packaging, USA
- Pasteurpipetten 230 mm Roth, Deutschland
- Pipettenspitzen ep T.I.P.S Standard Eppendorf, Deutschland
- Pipettenspitzen Tip One mit Filter Starlab, Deutschland
- Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml Eppendorf, Deutschland
- Biozym, Deutschland
- Sarstedt, Deutschland
- Spritzen 5 ml B. Braun, Deutschland
- Spritzenvorsatzfilter CM Membran 0,22 μ m Qualilab, Frankreich
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, Polycarbonat Beckmann, USA

4.1.5 Zellen

- Library Efficiency DH5 α Competent Cells Invitrogen, USA
- One Shot Top 10 Chemically Competent Cells Invitrogen, USA
- PC-12 Zellen ATCC, USA

4.1.6 Chemikalien

- 10x DyNAzyme Buffer F-511 Finnzymes, Finnland
- 2,5x Sequencing Buffer; Institut für Zellbiochemie und
BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix, klinische Neurobiologie, UKE,
Version 1.1 Deutschland/
Applied Biosystems, USA
- 5x First-Strand Buffer Invitrogen, USA
- Agarose Biozym, Deutschland
- β -Mercaptoethanol Roth, Deutschland
- DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium Dako, Dänemark
- dNTP Mix F-560, Finnzymes, Finnland
je 10 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP
- DTT (Dithiothreitol) 0,1 M Invitrogen, USA
- DyNAzyme DNA Polymerase F-500, 2U/ μ l Finnzymes, Finnland
- Ethanol 100%, 70% Apotheke, UKE, Deutschland

- Ethidiumbromid, 1% in wässriger Lösung Serva, Deutschland
- Expand Long Template PCR System 10x Puffer Roche, Schweiz
- Expand Long Template PCR System Roche, Schweiz
DNA Polymerase Mix, 5 U/ μ l
- Isopropanol Sigma-Aldrich, USA
- Kollagen aus Kalbshaut MP Biomedicals, USA
(löslich, lyophilisiert, salzfrei)
- LB-Agar USB, USA
- Lipofectamine 2000, 1 mg/ml Invitrogen, USA
- Oligo(dT)₁₂₋₁₈, 0,5 μ g/ μ l Invitrogen, USA
- OptiMEM I Invitrogen, USA
- Penicillin-Streptomycin, Invitrogen, USA
10.000 U/ml Penicillin G,
10.000 μ g/ml Streptomycinsulfat
- Pferdeserum, hitze-inaktiviert Invitrogen, USA
- Proteinase K, 2 μ g/ μ l Invitrogen, USA
- RNaseH, 2 U/ μ l Invitrogen, USA
- RNase OUT, 40 U/ μ l Invitrogen, USA
- RPMI 1640 mit L-Glutamin Invitrogen, USA

- SOC-Medium Invitrogen, USA
- SuperScript II RNA H⁻ Reverse Transkriptase, 200 U/ μ l Invitrogen, USA
- Trypsin/EDTA, 0,25%/0,02% in PBS Biochrom AG, Deutschland

4.1.7 *Lösungen*

- 17 β -Östradiol: lösliches E2 (E4389, Sigma-Aldrich, USA), 1 μ M in sterilem dH₂O
- Ampicillin, Natriumsalz (Sigma-Aldrich, USA) :
 - gelöst 100 mg/ml in 70%igem Ethanol, steril filtriert
- DAPI (Sigma-Aldrich, USA) :
 - gelöst 10 mg/ml in dH₂O
 - verdünnt 0,1 ng/ μ l in PBS (pH 7,4)
- DNA-Ladepuffer, 6x :
 - 0,025% Bromphenol Blau (Natriumsalz, Sigma-Aldrich, USA)
 - 0,025% Xylencyanol FF (USB, USA)
 - 30% Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)
 - dH₂O, steril
- DNA-Marker: 100 bp Marker und 1 kb Marker:

- 43 ng/ μ l DNA-Marker (100 bp DNA Ladder/1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, USA)
 - DNA-Ladepuffer, 0,8x (0,03‰ Bromphenol Blau, 0,03‰ Xylencyanol FF, 3,9% Glycerol)
 - dH₂O
-
- Gentamicin, 50 mg/ml in sterilem dH₂O (Sigma-Aldrich, USA):
 - verdünnt auf 50 μ g/ml in sterilem dH₂O
 - Glycerol : Glycerol (Sigma-Aldrich, USA) 50%ig in dH₂O (steril)
 - Kanamycin (781 μ g/mg, USB, USA) :
 - gelöst 25 mg/ml in sterilem dH₂O
 - LB-Medium :
 - 2% LB-Broth (Sigma-Aldrich, USA) in dH₂O, autoklaviert
 - Natriumazetat 0,3 M: Natriumazetat-Trihydrat (Sigma-Aldrich, USA) 0,3 M in dH₂O, steril filtriert
 - Natriumcitrat (0,079 M) :
 - Trinatriumcitrat-Dihydrat (Merck, Deutschland) 0,079 M in dH₂O
 - pH 3,7 eingestellt mit 1 N HCl (Merck, Deutschland), steril filtriert
 - NGF: 100 μ g/ml NGF 7S, Maus (Invitrogen, USA) in PBS mit 1 % Albumin, bovine (Sigma-Aldrich, USA), steril filtriert

- Paraformaldehyd (reinst, Merck, Deutschland) 4% in PBS
- PBS pH 7,4 :
 - 5 g Tabletten (Invitrogen, USA) + 500 ml Aqua iniectionabilia (Baxter, USA)

(0,14 M NaCl, 0,01 M PO₄ Puffer, 0,003 M KCl)
 - pH 7,4 eingestellt mit 2 N HCl (Merck, Deutschland)
- TBE 0,5x : TBE 10x (USB, USA) 1:20 in dH₂O
- TE pH 8,0 :
 - 10 mM Tris (Ultra Qualität, Roth, Deutschland), pH 8,0
 - 1 mM EDTA (Dinatriumsalz:Dihydrat, > 99%, Sigma-Aldrich, USA),
pH 8,0
 - steriles dH₂O

4.1.8 Vektoren

pSG5-hER β :

Der Vektor pSG5-hER β wurde zur Klonierung des hER β -Gens verwendet. pSG5-hER β beinhaltet den SV40- und T7-Promotor, ein β -Globulinintron, ein Polyadenylierungssignal und einen Origin of Replication (ori). Die Selektion transformierter Bakterienklone auf Agarplatten ist über eine Ampicillinresistenz möglich (s. Abb. 2). pSG5-hER β wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hubertus Jarry (Universität Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

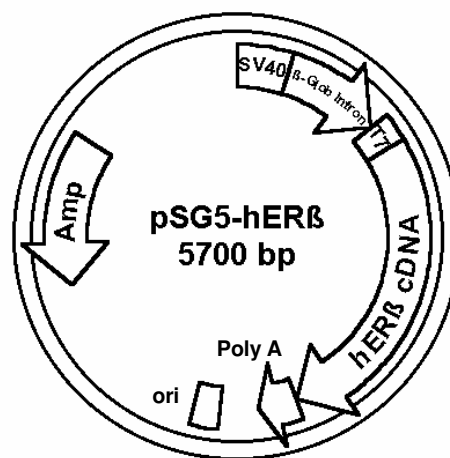


Abb. 2: Das Plasmid pSG5-hER β enthält die cDNA für das hER β -ORF (hER β cDNA). Neben SV40- (SV40) und T7-Promotor (T7) sind das β -Globulinintron (β -Glob intron), ein Polyadenylierungssignal (Poly A) und ein Origin of Replication (ori) vorhanden. Zur Selektion transformierter Bakterienklone auf Agarplatten ist eine Ampicillinresistenz (Amp) eingefügt.

pDONR201:

Für die Klonierung des humanen ER- β -Gens in einen Fluoreszenzvektor wurde das Gateway-System der Firma Invitrogen verwendet. Dieses beinhaltet die Verwendung von so genannten Entryklonen. Zur Erstellung von Entryklonen werden so genannte Donorvektoren benötigt. In dieser Arbeit wurde als Donorvektor pDONR201 (Invitrogen, USA) verwendet. pDONR201 ist 4470 bp groß und enthält für die Einklonierung eines Gens mit dem Gateway-System eine Gateway-Kassette. Diese beinhaltet die *attP Sites* zur Klonierung mittels Gateway-Technologie, ein Chloramphenicolresistenzgen (Cm) und das *ccdB*-Gen. Letzteres kodiert für ein Protein, welches die E. coli-DNA-Gyrase und somit das Wachstum transformierter Bakterien hemmt. Dies ermöglicht die Selektion von Bakterien, die mit Vektoren transformiert wurden, in denen die Gateway-Kassette gegen ein

einkloniertes Gen ausgetauscht wurde. Das Plasmid besitzt darüber hinaus einen pUC-ori für die Replikation in *E. coli* sowie die Transkriptionsterminierungssequenzen T1 und T2 zum Schutz des einklonierten Gens vor Expression durch vektorkodierte Promotoren. Eine Selektion mit dem Vektor transformierter Bakterienklone wird durch ein Gen ermöglicht, das eine Kanamycinresistenz bewirkt (s. Abb. 3). Für die Sequenzierung bieten sich die Positionen 300-324 (Vorwärtsprimer) bzw. 2769-2792 (Rückwärtsprimer) an (Invitrogen 2002).

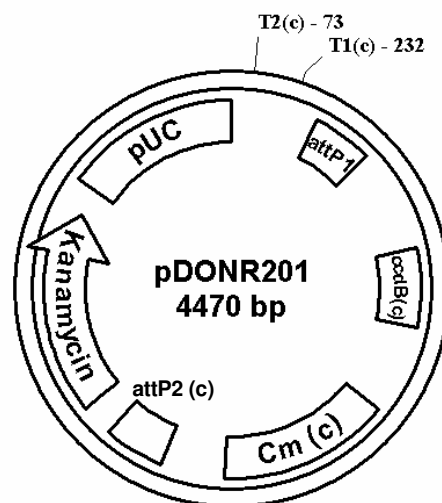


Abb. 3: Der Donorvektor pDONR201 enthält einen pUC-Origin (pUC) für die Replikation in *E. coli* sowie die Transkriptionsterminierungssequenzen T1 und T2. Außerdem sind eine Kanamycinresistenz sowie die Gateway-Kassette vorhanden. Letztere setzt sich aus den Attachment Sites attP1 und attP2, dem ccdB-Gen und einem Chloramphenicolresistenzgen (Cm) zusammen. Zahlen mit voranstehendem Spiegelstrich bezeichnen die Startpositionen von T1 und T2. (c) = komplementärer Strang (Invitrogen 2002).

pdECFP:

Bei dem 6 kbp großen Zielvektor handelt es sich um eine modifizierte Variante des Vektors pECFP-C1 (Clontech, USA, ehemals BD Biosciences Clontech). Er ermöglicht die N-terminale Fusion eines Gens an den C-Terminus des Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP). Bei ECFP handelt es sich um eine Variante des Green Fluorescent Protein (GFP) mit erhöhter Leuchtkraft und Löslichkeit. Das Hauptexzitationsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 433 nm und ein weiteres Exzitationsmaximum bei 453 nm. Das Hauptemissionsmaximum befindet sich bei 475 nm, ein zusätzliches Emissionsmaximum bei 501 nm (BD Biosciences Clontech 2002b).

Im Gegensatz zum Originalvektor enthält das Plasmid ein Gen für eine Ampicillinresistenz, sowie eine Gateway-Kassette inklusive *attR Sites* und *ccdB*-Gen (Simpson et. al. 2000). Der Vektor beinhaltet den CMV Immediate Early Promotor, SV40 Early Promotor und -polyadenylierungssequenzen, sowie SV40-, pUC- (Replikation in *E. coli*) und f1-Origins (ssDNA-Produktion; s. Abb. 4). Zur Sequenzierung sind komplementäre Primer zu den Positionen 1266-1287 des ursprünglichen Vektors pECFP-C1 vorgesehen (BD Biosciences Clontech 2002b). Der Vektor wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Stefan Wiemann (DKFZ, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

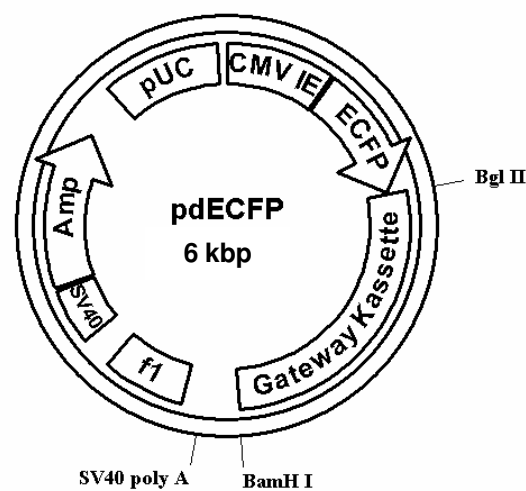


Abb. 4: Der Zielvektor pdECFP enthält ECFP stromaufwärts einer Gateway-Kassette, die durch Verdau mit Bgl II und BamH I eingefügt wurde (Simpson et. al. 2000). Außerdem sind ein pUC-Origin (pUC), der CMV Intermediate Early Promotor (CMV IE), der f1-Origin (f1), SV40 Early Promotor und SV40-Origin (SV40) sowie SV40-Polyadenylierungssequenzen (SV40 poly A) vorhanden. Die Selektion auf Kulturplatten erfolgt über eine Ampicillinresistenz (Amp, Simpson et. al. 2000; modifiziert nach BD Biosciences Clontech 2002b).

pdEYFP:

Der Zielvektor pdEYFP (6 kbp), eine modifizierte Variante des Vektors pEYFP-N1 (Clontech, USA, ehemals BD Biosciences Clontech), ist analog zu pdECFP aufgebaut. Auch EYFP stellt eine GFP-Variante dar. Das Exzitationsmaximum liegt bei 513 nm und das Emissionsmaximum bei 527 nm (BD Biosciences Clontech 2002a).

Die Kanamycinresistenz wurde bei diesem Vektor gegen eine Gentamycinresistenz ausgetauscht (Simpson et. al. 2000). Das Plasmid erlaubt eine C-terminale Fusion eines Gens

an den N-Terminus des Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP, s. Abb. 5). Zur Sequenzierung wurden Primer komplementär zu Position 745-724 des ursprünglichen Vektors pEYFP-N1 benutzt (BD Biosciences Clontech 2002a). Der Vektor wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Stefan Wiemann (DKFZ, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

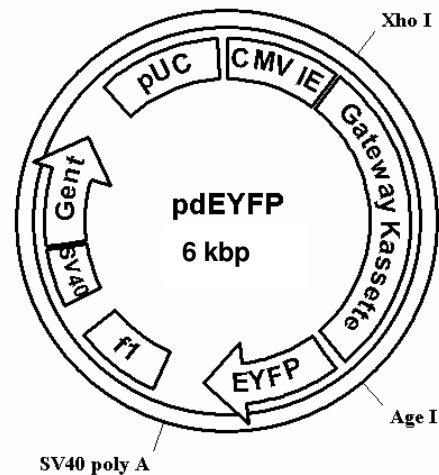


Abb. 5: Der Zielvektor pdEYFP enthält EYFP stromabwärts einer Gateway-Kassette, die durch Verdau mit Xho I und Age I eingefügt wurde (Simpson et. al. 2000). Außerdem sind ein pUC-Origin (pUC), der CMV Intermediate Early Promotor (CMV IE), ein f1-Origin (f1), SV40 Early Promotor und SV40-Origin (SV40) sowie SV40-Polyadenylierungssequenzen (SV40 poly A) vorhanden. Die Selektion auf Kulturplatten erfolgt über eine Gentamycinresistenz (Gent, Simpson et. al. 2000; modifiziert nach BD Biosciences Clontech 2002a).

4.1.9 Primer

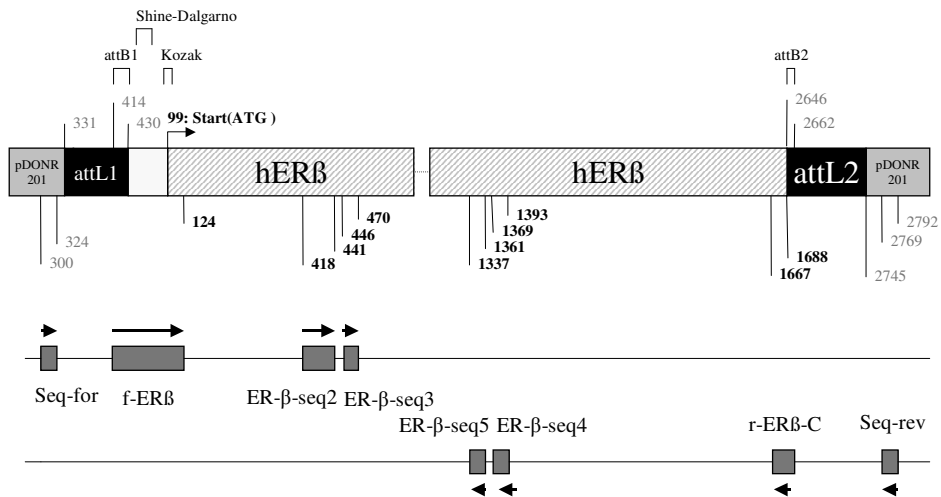
phER β -C

Abb. 6: Der Entryvektor phER β -C (oben) und die für Klonierung und Sequenzierung verwendeten Primer (unten). Zahlen geben Basenpaarpositionen im Gen für hER β (dunkel) bzw. im ursprünglichen Donorvektor pDONR201 vor Einklonieren von hER β (hell) an. Im Text erwähnte Sequenzen sind beschriftet. Pfeile geben die Syntheserichtung der Primer wieder.

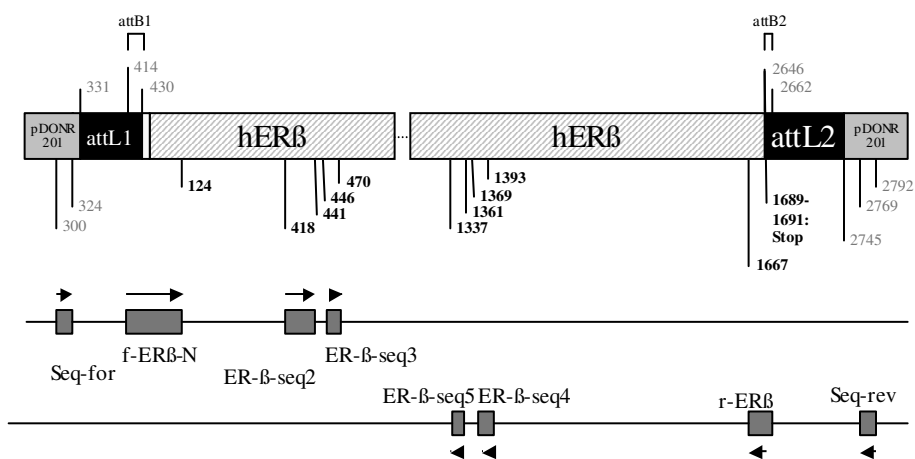
phER β -N

Abb. 7: Der Entryvektor phER β -N (oben) und die für Klonierung und Sequenzierung verwendeten Primer (unten). Zahlen geben Basenpaarpositionen im Gen für hER β (dunkel) bzw. im ursprünglichen Donorvektor pDONR201 vor Einklonieren von hER β (hell) an. Im Text erwähnte Sequenzen sind beschriftet. Pfeile geben die Syntheserichtung der Primer wieder.

Alle folgenden Primer wurde von MWG Biotech, Deutschland angefertigt:

- (1) *fERβ*: 5'-ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt cga agg aga tag aac cat gga tat aaa
aaa ctc acc atc tag-3'
- (2) *r-ERβ-C*: 5'-ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc ctg aga ctg tgg gtt ctg gga g-3'
- (3) *fERβ-N*: 5'-ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt cga tat aaa aaa ctc acc atc tag-3'
- (4) *rERβ*: 5'-ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc tca ctg aga ctg tgg gtt ctg gga g-3'
- (5) *Seq-for*: 5'-tcg cgt taa cgc tag cat gga tct c-3'
- (6) *Seq-rev*: 5'-gta aca tca gag att ttg aga cac-3'
- (7) *ER-β-seq2*: 5'-ggg gac aag caa gat cgc tag aac -3'
- (8) *ER-β-seq3*: 5'-ctt acc tgt aaa cag aga gac act g -3'
- (9) *ER-β-seq4*: 5'-gcg ttc agc aag tga gcc agc ttc c -3'
- (10) *ER-β-seq5*: 5'-gtc agc atc ctg ggt cgc tgt gac c -3'
- (11) *EGFP-N-SEQ*: 5'-cgt cgc cgt cca gct cga cca g -3'
- (12) *EGFP-C-SEQ*: 5'-cat ggt cct gct gga gtt cgt g -3'
- (13) *ER-beta-Ü3'*: 5'-gct gaa tgc cca cgt gct tcg c -3'
- (14) *ER-beta-Ü5'*: 5'-ctt gtg gtc tgc cga cca ggc c -3'

Die Bindungsstellen der Primer 1-10 an hERβ bzw. die Entryvektoren phERβ-C und phERβ-N sind in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt. Nachfolgend wird die Verwendung der Primer näher erläutert. Die Nummer des jeweiligen Primers ist jeweils in Klammern angegeben.

4.1.9.1 Erstellung attB-flankierter PCR-Produkte (*hERβ*-ORF) zur Klonierung in die Donorvektoren:

4.1.9.1.1 Für die C-terminale Fusion:

- attB1
Shine-Dalgarno Kozak
-
- *f-ERβ* (1): 5'-ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt cga agg aga tag aac cat gga tat aaa
aaa ctc acc atc tag-3'

Durch Verwendung des Primers wird ein PCR-Fragment erstellt, welches eine *attB1 Site* zur Einklonierung in einen Donorvektor besitzt und außerdem über die Shine-Dalgarno- und die Kozak Consensus Sequence (inkl. Start-Codon) für eine effizientere Expression verfügt (Invitrogen 2002).

- attB2
-
- *r-ERβ-C* (2): 5'-ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc ctg aga ctg tgg gtt ctg gga g-3'

Der Aufbau des Oligonukleotides erlaubt die Erstellung eines DNA-Stückes mit attB2 Site für den C-Terminus des Rezeptors.

4.1.9.1.2 Für die N-terminale Fusion:

- attB1
-
- *f-ERβ-N* (3): 5'-ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt cga tat aaa aaa ctc acc atc tag-3'

Der Primer bewirkt die Amplifikation eines Fragmentes mit einer attB1 Site für den N-Terminus des Rezeptors.

- attB2
Stop
-
- *r-ERβ* (4) :5'-ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc tca ctg aga ctg tgg gtt ctg gga g-3'

Durch Benutzung dieses Primers wird ein Nukleotid vervielfältigt, welches über eine *attB2 Site* und ein Stopcodon (Stop) für den C-Terminus von hER β verfügt.

4.1.9.2 Sequenzierung der Entryklone:

Die Bindungsstellen und Syntheserichtung von Seq-for (5), Seq-rev (6), ER- β -seq2 (7), ER- β -seq3 (8), ER- β -seq4 (9) und ER- β -seq5 (10) an phER β sind in Abb. 6 und Abb. 7 angegeben.

4.1.9.3 Sequenzierung von Expressionsvektoren und Transkript, RT-PCR des Transkriptes:

EGFP-N-SEQ (11), EGFP-C-SEQ (12), ER-beta-Ü3' (13) und ER-beta-Ü5' (14) dienen der Sequenzierung von Expressionsvektoren und Transkripten, sowie der Durchführung einer Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).

4.2 Methoden

4.2.1 Gießen von LB-Agarplatten

Für die Anzucht von Bakterien wurden Agarplatten mit Selektivantibiotika gegossen. Hierzu wurden 32 g/l LB-Agar mit dH₂O verrührt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem anschließenden Abkühlen auf ca. 55 °C erfolgte unter sterilen Bedingungen die Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration = 100 µg/ml), Gentamicin (Endkonzentration = 0,1 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration = 50 µg/ml). Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur aushärten gelassen und danach bei 4 °C gelagert.

4.2.2 Maxiprep (QIAfilter Plasmid Maxi Kit)

Aus angezüchteten Bakterienvorkulturen (in 100 ml LB-Medium) wurden Plasmide bei Raumtemperatur isoliert. Der initialen Zentrifugation mit 6000 g für 15 min bei 4 °C schloss sich die Resuspension der Bakterienpellets in 10 ml Puffer P1 an. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml Puffer P2 und nach Mischen der Suspensionen eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. 10 ml vorgekühlter Puffer P3 wurde zugefügt und die Ansätze gemischt. Danach wurde das Lysat in den Spritzenkörper der QIAfilter Filtrationseinheit gefüllt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine QIAGEN-tip 500 wurde mit 10 ml Puffer QBT über einem Erlenmeyerkolben equilibriert und die vorbereitete QIAfilter Filtrationseinheit durch die equilibrierte QIAGEN-tip filtriert. Anschließend folgte das Waschen der Säule mit 2 x 30 ml Puffer QC. Die DNA wurde schließlich mit 15 ml Puffer QF eluiert. Schließlich erfolgte die Präzipitation der DNA mit 10,5 ml Isopropanol durch Mischen und Zentrifugation mit 15 000 g für 30 min bei 4 °C. Die gefällten Plasmide wurden für ca. 10 min an der Luft getrocknet und vorsichtig in 300 µl TE (pH 8,0) resuspendiert.

4.2.3 Photometrische Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung (Ultraspec 3000)

Die zu messenden Proben wurden 1:100 (1 µl DNA oder RNA + 99 µl steriles dH₂O) verdünnt. Initial erfolgte ein Nullabgleich mit 100 µl dH₂O. Im Anschluss wurden die verdünnten Nukleinsäureproben mit einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration wurde gemäß der Formel:

$$\text{Konzentration} = \text{Absorption} \times \text{Faktor}$$

berechnet. Der Faktor betrug 50 µg/ml für DNA und 40 µg/ml für RNA.

4.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden 0,01 g/ml Agarose und 50 ml 0,5x TBE in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in der Mikrowelle mit 700 W für 2-2,5 min aufgeköcht bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach Abkühlen des Kolbens unter kaltem fließendem Wasser auf ca. 50-60 °C erfolgte die Zugabe von 2,5 µl 1%igem Ethidiumbromid. Das Gel wurde ca. 30-45 min aushärten gelassen. Zur Vorbereitung der DNA-Proben wurden 15 µl PCR-Produkt bzw. 3 µl Plasmid (verdünnt mit 15 µl dH₂O) mit 5 µl 6x DNA-Ladepuffer vermischt. Der Elektrophoresetank wurde mit 0,5x TBE Puffer gefüllt Die Gelkammern wurden mit den Proben bzw. 23 µl DNA-Marker (100 bp DNA-Marker oder 1 kb DNA-Marker) beladen. Die Auftrennung der Proben geschah bei 100 V. Nachfolgend wurde das Gel mittels Kodak EDAS 120 System und der Software Kodak ds 1D bei UV-Durchleuchtung photographiert.

4.2.5 Gelextraktion (MinElute Gel Extraction Kit)

Die amplifizierte und elektrophoretisch aufgetrennten *attB*-PCR-Produkte wurden mit dem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und im Reaktionsgefäß mit 3 Gelvolumina Puffer QG bei 50 °C für ca. 10 min inkubiert bis die Gelstücke aufgelöst waren. Zwischendurch wurden die Ansätze gevortext. Nach Zugabe von einem Gelvolumen Isopropanol erfolgte die Überführung auf eine MinElute Säule auf einem Collection Tube. Danach wurden die Ansätze mit 13 000 g für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. 500 µl Puffer QG wurden hinzugegeben und nach Zentrifugation mit 10 000 g für 1 min wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation mit 13 000 g für 1 min wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und die DNA mit 50 µl Puffer EB, einminütiger Inkubation und Zentrifugation mit 13 000 g für 1 min eluiert. Die eluierte DNA wurde anschließend erneut auf die Säule gegeben und diese mit 10 000 g für 1 min zentrifugiert. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei -20 °C.

4.2.6 Klonierung des *bER β* -Gens

4.2.6.1 Klonierungsstrategie

Für die Erstellung der Expressionsvektoren wurde die Gateway-Technologie verwendet. Basierend auf heterologer Rekombination nutzt dieses Verfahren Mechanismen, welche dem Bakteriophagen λ das Wechseln zwischen lysogenem und lytischem Zyklus gestattet. Das Gateway-Prinzip besteht aus zwei Reaktionen: Der BP-Rekombination und der LR-Rekombination.

Die BP-Rekombination verläuft analog dem Wechsel vom lytischen in den lysogenen Zyklus des λ -Phagen in *Escherichia coli*, also der Integration des Virus in das Wirtsgenom. Vermittelt wird dieser Schritt durch BP Clonase, einer Mischung verschiedener Proteine aus *E. coli* und Phagen. Die BP-Rekombination ermöglicht das Einklonieren von DNA-Fragmenten in geeignete Donorvektoren, wodurch ein so genannter Entryklon entsteht. Das Umklonieren des gewünschten Gens in einen Zielvektor (Erstellung eines Expressionsvektors) erfolgt durch die LR-Rekombination. Diese läuft in Analogie zum Wechsel vom lysogenen in den lytischen Zyklus des λ -Phagen in *Escherichia coli*, also der Desintegration des Phagen aus dem Wirtsgenom, ab und wird durch einen Enzymmix namens LR Clonase katalysiert.

Voraussetzung für das Klonieren mit dem Gateway-System ist die Verwendung geeigneter Vektoren, sowie die entsprechende Vorbereitung des DNA-Fragmentes, welches das zu klonierende Gen enthält. Sämtliche an den Gateway-Reaktionen teilnehmende Vektoren und Genfragmente müssen nämlich *Attachment Sites* (*att*) beinhalten, welche die Anlagerung, Spaltung und Ligation der zu rekombinierenden DNA-Abschnitte ermöglichen. In der BP-Rekombination wird ein von zwei *attB Sites* (*attB1* und *attB2*) flankiertes DNA-Fragment in einen Donorvektor eingefügt, der im Besitze zweier *attP Sites* (*attP1* und *attP2*) ist. Die hierdurch entstehenden *attL Sites* (*attL1* und *attL2*) stellen Hybride aus den Ursprünglichen *attB* und *attP Sites* dar. Das ausgeschnittene Fragment des Donorvektors enthält nun zwei *attR Sites* (*attR1* und *attR2*), bei denen es sich ebenfalls um Hybride handelt. Durch die nachfolgende LR-Rekombination wird das inklonierte, *attL*-flankierte DNA-Fragment in einen Zielvektor umkloniert, welcher auch über zwei *attR Sites* verfügt. Endprodukte sind der das zu exprimierende Gen enthaltene Expressionsvektor mit neuen *attB Sites*, sowie ein Nebenprodukt mit *attP Sites*. Sämtliche *att Sites* stellen Hybride der beteiligten *att Sites* vor der jeweiligen Rekombination dar. Die Rekombination findet konservativ in der allen *att Sites*

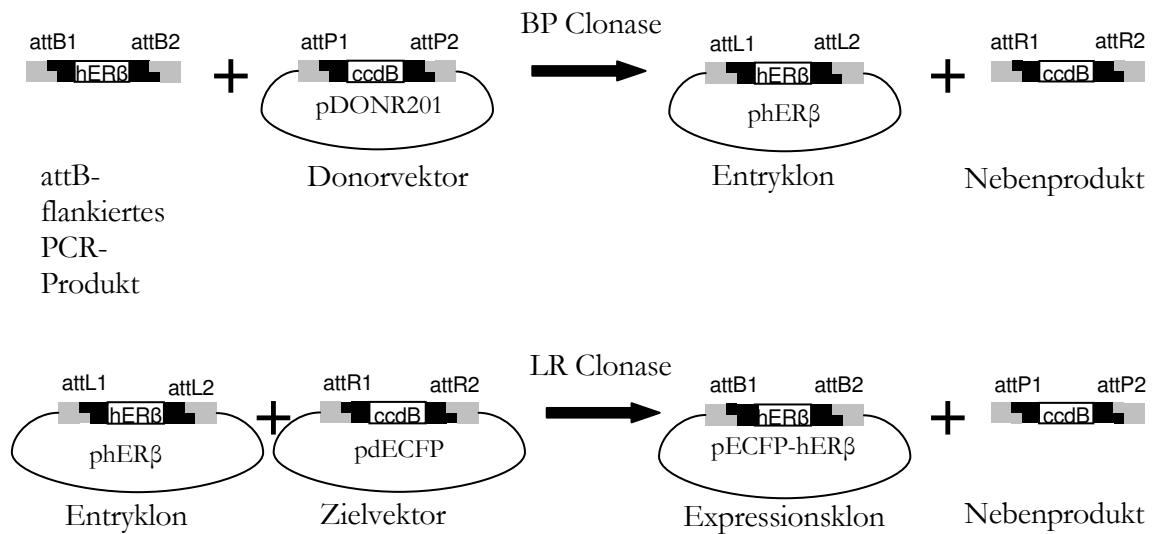


Abb. 8: Prinzip der Gateway-Technologie: BP-Rekombination (oben) und LR-Rekombination (unten) (Invitrogen 2002, modifiziert).

gemeinsamen Kernregion statt. Sie ist absolut spezifisch, Rekombinationen finden nur zwischen *attB1* und *attP1* bzw. *attL1* bzw. *attR1*, sowie zwischen *attB2* und *attP2* bzw. *attL2* und *attR2* statt (s. Abb. 8, Invitrogen 2002).

4.2.6.2 Amplifikation des *hERβ*-Gens

Das Erzeugen und Amplifizieren der *attB*-flankierten *hERβ*-DNA-Fragmente für die Klonierung in die Donorvektoren geschah mittels PCR. Als Quelle für *hERβ* fungierte das ca. 5,7 kbp große Expressionsplasmid *pSG5-hERβ*, welches in One Shot kompetenten *E. coli* vervielfältigt wurde (analog Protokoll „Vermehrung der Expressionsvektoren“ mit 250 μ l SOC-Medium, s. 4.2.6.6). Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin selektiert und in 100 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin über Nacht angeimpft. Die Isolierung erfolgte durch Maxiprep (s. 4.2.2). Für die Amplifikationsansätze wurden 2 pmol/ μ l Vorwärtsprimer, 2 pmol/ μ l Rückwärtsprimer, 1x Expand Long Template PCR System Puffer, 50 mU/ μ l Expand Long Template DNA Polymerase Mix, 1,6 ng/ μ l *pSG5-hERβ*, dNTP Mix (je 0,2 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP) und 81% dH₂O (steril) zusammenpipettiert. Die Kontrollen wurden ohne Plasmid durchgeführt. Als Primer dienten für die N-terminale Kopplung als Vorwärtsprimer *f-ERβ-N* (Primer (3)) und als

Rückwärtsprimer r-ER β (Primer (4)). Für die C-terminale Kopplung wurden der Vorwärtsprimer f-ER β (Primer (1)) und der Rückwärtsprimer r-ER β -C (Primer (2)) verwendet. Die Ansätze wurden im Thermocycler nach folgendem Programm amplifiziert:

1.	96 °C	5 min	} 40 Zyklen
2.	95 °C	1 min	
3.	70 °C	30 s	
4.	70 °C	30 s	
5.	72 °C	1 min	
6.	72 °C	5 min	
7.	20 °C	Halten	

Die Aufheiz-/Abkühlgeschwindigkeit betrug 3 °C/s. Die Temperatur des Cyclerdeckels wurde auf 100°C gesetzt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese (s. 4.2.4) aufgetrennt und durch Gelextraktion isoliert (s. 4.2.5).

4.2.6.3 Erstellung der Entryklone

Die amplifizierten attB-PCR-Produkte (je eins für N- und C-terminale Kopplungsvariante) wurden jeweils mittels Gateway-Technologie in den Donorvektor pDONR201 einkloniert (BP-Rekombination, je ein Ansatz für N- bzw. C-terminale Ligation). Bei Raumtemperatur wurden 5 μ l attB-PCR-Produkt pro Ansatz von 16 μ l, 19 ng/ μ l pDONR201, 1,25x BP Clonase Reaction Buffer und 0,3x TE Puffer (pH 8,0; 3,13 mM Tris und 313 μ M EDTA) zusammenpipettiert. Der BP Clonase Enzym Mix wurde 2 min auf Eis aufgetaut und kurz gevortext. Nach der Zugabe von 0,2x BP Clonase Enzym Mix zu jedem Ansatz wurden diese gevortext und für 3 h bei 25 °C inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Zugabe von 182 ng/ μ l Proteinase K, sowie eine Inkubation für 10 min bei 37 °C.

4.2.6.4 Vermehrung der Entryklone

Die hergestellten Entryklone für die N-terminale Fusion (phER β -N) und die C-terminale Fusion (phER β -C) wurden wie vom Hersteller vorgegeben in den E. coli-Stamm DH5 α

transformiert. Hierzu wurden je 1 μl der BP-Reaktion (s. 4.2.6.3, phER β) zu 50 μl DH5 α hinzugegeben und die Ansätze auf Eis 30 min inkubiert. Nach einer anschließenden Erhitzung auf 42 °C für 30 s erfolgte ein Transfer der Proben auf Eis sowie die Zugabe von 450 μl raumtemperiertem SOC-Medium. Die Ansätze wurden dann bei 37 °C für 1 h horizontal geschüttelt (200/min). Danach wurden 100 μl Bakteriensuspension auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin ausplattiert. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Am nächsten Tag folgte das Aufpicken jeweils einer Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze und die Überführung in 5 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin. Die angeimpften Vorkulturen wurden bei 37 °C und 200/min im Schüttler über Nacht kultiviert.

Die Isolation der Plasmide geschah zunächst durch Miniprep (s. 4.2.7). Nach erneuter Transformation der isolierten Plasmide und Anzuchtung mit anschließender Kultur in 5 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin über Nacht wurden die Bakterien eingefroren (s. 4.2.8). Sie wurden später auf Eis aufgetaut. Aus jedem Ansatz wurden 0,2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Bakteriensuspension in LB-Medium ohne Antibiotikum im Schüttler bei 225/min und 37 °C über Nacht kultiviert. Die Isolation der Plasmide erfolgte durch Maxiprep (s. 4.2.2). Im Anschluss fand eine Überprüfung der Vektoren per Agarosegelelektrophorese (s. 4.2.4) und DNA-Sequenzierung (s. 4.2.9) statt.

4.2.6.5 *Erstellung der Expressionsvektoren*

Das hER β -Gen wurde in der LR-Rekombinationsreaktion aus den Entryklonen phER β -N bzw. -C in die Zielvektoren umkloniert und somit an den C-Terminus des Gens für ECFP (N-terminale Fusion von hER β) bzw. den N-Terminus von EYFP (C-terminale Fusion) gekoppelt. Zusammenpipettiert wurden bei Raumtemperatur 18,7 ng/ μl pECFP bzw. pEYFP, 16,8 ng/ μl phER β -N bzw. 16,9 ng/ μl phER β -C, 1,25x LR Clonase Reaction Buffer und 0,4x (phER β -N) bzw. 0,3x (phER β -C) TE Puffer (pH 8,0; 3,9 mM bzw. 3,1 mM Tris und 0,4 mM bzw. 0,3 mM EDTA). Nach dem Auftauen des BP Clonase Enzym Mixes auf Eis (2 min) und kurzem zweimaligem Vortexen desselben wurde 0,2x LR Clonase Enzym Mix zu jedem Ansatz hinzugefügt und die Ansätze gevortext. Nach Inkubation für 2 h (pECFP) bzw. 4 h (pEYFP) bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 182 ng/ μl Proteinase K und eine Inkubation für 10 min bei 37 °C.

4.2.6.6 Vermehrung der Expressionsvektoren

Die erstellten Expressionsvektoren pECFP-hER β und phER β -EYFP wurden in DH5 α -Bakterien transformiert. Nach Zugabe von je 1 μ l LR-Reaktion (s. 4.2.6.5, pECFP-hER β bzw. phER β -EYFP) zu 50 μ l DH5 α und Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Ansätze für 30 s auf 42 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. 450 μ l raumtemperiertes SOC-Medium wurden hinzugegeben und 1h bei 37 °C horizontal geschüttelt. 100 μ l Bakteriensuspension wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin (pECFP-hER β) bzw. 0,1 μ g/ml Gentamicin (phER β -EYFP) ausplattiert. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C herangezüchtet und am nächsten Tag jeweils eine Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze aufgepickt und in 5 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin (pECFP-hER β) bzw. 0,1 μ g/ml Gentamicin (phER β -EYFP) überführt. Diese angeimpften Vorkulturen wurden einer Inkubation bei 37 °C im Schüttler über Nacht unterzogen. Sie wurden eingefroren und nach dem Auftauen erneut ausplattiert, selektiert und in 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika über Nacht bei 37 °C im Schüttler angezüchtet.

Die Expressionsvektoren wurden durch Maxiprep (s. 4.2.2) isoliert. Im Anschluss fand eine Überprüfung der Vektoren per Agarosegelelektrophorese (s. 4.2.4) und DNA-Sequenzierung (s. 4.2.9) statt.

4.2.7 Miniprep (QIAprep Miniprep Kit)

Aus den angezüchteten Bakterienkulturen (in 5 ml LB-Medium mit jeweiligem Selektivantibiotikum) wurden die Plasmide bei Raumtemperatur isoliert. Nach einer initialen Sedimentation mit 4000 g für 5 min bei 4 °C wurden Bakterienpellets in 250 μ l Puffer P1 (4 °C) resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. 250 μ l Puffer P2 wurden zugefügt und gemischt. Im Anschluss wurden 350 μ l Puffer N3 zugegeben und nach Mischen der Ansätze diese mit 14 000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Spin Columns in Collection Tubes gegeben und anschließend für 1 min bei Raumtemperatur mit 13 000 g zentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe von 500 μ l Puffer PB auf die Säule sowie eine erneute Zentrifugation mit 13 000 g für 1 min bei Raumtemperatur. Nun wurden 750 μ l Puffer PE auf die Säule pipettiert und erneut mit 13 000 g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt

und bei 13 000 g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Umstecken der Säule in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die Zugabe von 50 µl Elutionspuffer EB sowie eine Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur. Die Plasmide wurden dann durch einminütige Zentrifugation bei 13 000 g eluiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.8 Einfrieren von Bakterien

Zur späteren Verwendung der transformierten Bakterien wurden sie eingefroren. Dies geschah durch eine Sedimentation bei 2800 g für 5 min bei 4 °C. die Bakterienpellets wurden in 500 µl 50%igem Glycerol resuspendiert und im Reaktionsgefäß bei – 80 °C eingefroren.

4.2.9 DNA-Sequenzierung

Um die DNA-Sequenzen von Vektoren und Transkripten zu überprüfen, wurden 0,5x Sequencing Buffer, 0,2x BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix, 10 pmol/µl Primer (s. Tab. 1) und ca. 25 ng/µl DNA zusammenpipettiert. Die Ansätze wurden mit sterilem dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Nachfolgend lief die Sequenzierungsreaktion entsprechend

Primer		sequenzierte DNA		
Name	Nummer	Entryklone	Expressionsvektoren	Transkripte
Seq-for	(5)	+	-	-
Seq-rev	(6)	+	-	-
ER-beta-seq2	(7)	+	-	-
ER-beta-seq3	(8)	+	-	-
ER-beta-seq4	(9)	+	-	-
ER-beta-seq5	(10)	+	-	-
EGFP-N-SEQ	(11)	-	+	+
EGFP-C-SEQ	(12)	-	+	+
ER-beta-Ü3'	(13)	-	+	+
ER-beta-Ü5'	(14)	-	+	+

Tab. 1: Verwendete Sequenzierungsprimer. Die Primer Seq-for (5), Seq-rev (6), ER-β-seq2 (7), ER-β-seq3 (8), ER-β-seq4 (9) und ER-β-seq5 (10) wurden zur Sequenzierung der Entryklone phERβ-N und -C verwendet. EGFP-N-SEQ (11), EGFP-C-SEQ (12), ER-beta-Ü3' (13) und ER-beta-Ü5' (14) dienten der Sequenzierung der Expressionsvektoren pECFP-hERβ und phERβ-EYFP sowie der Sequenzierung der entsprechenden Transkripte. „+“ kennzeichnet die Verwendung des jeweiligen Primers. In der jeweiligen Sequenzierungsreaktion nicht verwendete Primer sind durch „-“ markiert.

nachfolgendem Programm im Thermocycler ab:

1.	96 °C	5 min	
2.	96 °C	50 s	} 35 Zyklen
3.	50 °C	10 s	
4.	60 °C	4 min	
5.	20 °C	Halten	

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mit 60 mM Natriumacetat und 75% Ethanol gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 12 000 g für 30 min bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Proben für 1-2 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Auftrennung und Analyse der gefällten DNA führte das Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durch.

Die erhaltenen Sequenzen wurden über die Datenbank *Blast2 Sequences* des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit der Nukleotidsequenz der mRNA des hER β (GI2911151, AB006590) verglichen.

4.2.10 Kollagenbeschichtung

Da PC-12 Zellen zwar schlecht an Plastik aber gut an Kollagen anhaften (Greene und Tischler 1976), wurden Kulturflaschen und -platten unter sterilen Bedingungen mit einer Kollagenlösung bestehend aus 75 mM Natriumcitrat (pH 7,4) plus 0,01% Kollagen beschichtet. Das Volumen betrug 6 ml/Flasche, 0,5 ml/Well (24-Well-Platten) und 0,25 ml/Well (Chamber Slide). Nach einer Einwirkzeit von mindestens einer Stunde wurde die Lösung abgesaugt und die Kulturgefäße unter der sterilen Arbeitsbank über Nacht leicht geöffnet trocknen gelassen. Am nächsten Tag wurden sie entweder sofort verwendet oder mit Parafilm abgedichtet bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.11 Zellkultur

Für die Experimente wurde die Sekundärzelllinie PC-12 verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Phäochromozytom der Ratte gewonnen wurde. Die Zellen weisen eine polygonale Morphologie auf und neigen zur Klumpenbildung. Sie haften schlecht an Plastik, aber gut an Kollagen. Unter Stimulation mit Nerve Growth Factor (NGF) bilden sie Zellfortsätze aus. PC-12 Zellen synthetisieren Katecholamine, v. a. Dopamin (Greene und Tischler 1976).

Die Arbeiten mit Zellen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Zellen wurden in kollagenbeschichteten Kulturflaschen mit einem Nährmedium bestehend aus RPMI 1640-Medium plus 15% Pferdeserum und 1% Penicillin-Streptomycin (100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycinsulfat) bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Ungefähr alle fünf Tage wurden die inzwischen konfluent gewordenen Zellen in eine neue, kollagenbeschichtete Flasche passagiert. Hierzu wurde das Nährmedium durch 5 ml Trypsin/EDTA ersetzt und die Zellen ca. fünf Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank trypsinisiert. Im Anschluss wurden 15 ml Nährmedium hinzugegeben und die Suspension fünf Minuten bei 20 °C mit 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert und bei mittlerer Stärke vorsichtig gevortext. 9 ml Nährmedium wurden hinzugefügt, erneut gevortext und die Zellen erneut bei 1200 g und 20 °C für fünf Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde genau wie zuvor zunächst in 1 ml und anschließend in 9 ml resuspendiert. Je nach Zelldichte (semiquantitativ viel bis wenig Zellen) wurden 0,5 bis 1,5 ml der Zellsuspension in die neue Kulturflasche gegeben und 20 ml Nährmedium hinzugefügt.

Für die Transfektionsexperimente wurden PC-12 Zellen auf kollagenbeschichteten 24-Well-Kulturplatten bzw. Chamber Slides ausgesät. Hierzu wurde beim Passagieren der Zellen die Zellkonzentration der Suspension mit Hilfe eines Neubauer-Hämozytometers ermittelt. Es wurde die Zellzahl in den vier Quadranten einer Zählkammerhälfte bestimmt und das arithmetische Mittel $\bar{x}_{\text{Zellen/Zählkammerquadrant}}$ errechnet. Daraufhin wurde das für die gewünschte Anzahl an Wells benötigte Volumen an Zellsuspension gemäß der Formel

$$\text{einzusetzendes Zellsuspensionsvolumen } [\mu\text{l}] = \frac{\text{gewünschte Zellzahl/Well}}{\bar{x}_{\text{Zellen/Zählkammerquadrant}} \times 10/\mu\text{l}} \times \text{Anzahl}_{\text{Wells}}$$

berechnet. Die gewünschte Zellzahl betrug 2000 Zellen/Well für die 24-Well-Platten und 1000 Zellen/Well für die Chamber Slides. Pro Well wurden 0,5 ml (24-Well-Platten) bzw. 0,25 ml (Chamber Slides) entsprechend mit Nährmedium verdünnter Zellsuspension eingesetzt. Die Zellsuspension wurde geschwenkt und gevortext. Es wurden 0,5 ml/Well bzw. 0,25 ml/Well der verdünnten Zellsuspension ausgesät. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, wobei 50 pg/ μ l NGF beigefügt wurden.

4.2.12 Transfektion und Stimulation der PC-12 Zellen

Die Transfektion wurde liposomenvermittelt unter Verwendung von Lipofectamine 2000 durchgeführt. Hierzu wurden die PC-12 Zellen sechs Tage auf 24-Well-Platten, wie oben beschrieben, bis zur Konfluenz kultiviert. Bei vorzeitigem Erreichen einer entsprechenden Zelldichte wurde entsprechend früher transfiziert. Am sechsten Tag wurde das NGF-haltige Nährmedium durch Nährmedium plus NGF, aber ohne Antibiotika ausgetauscht. Die Transfektion fand am folgenden Tag statt. Hierbei wurden 15 ng/ μ l (pECFP-hER β) bzw. 14 ng/ μ l (phER β -EYFP) DNA bzw. 38 ng/ μ l Lipofectamine 2000 jeweils mit OptiMEM I-Medium vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation wurden DNA- und Lipofectamine 2000-haltiges Medium zusammen geführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 min wurden der Ansatz 0,2-fach unter leichtem Schwenken der Kulturplatte in die Wells pipettiert. Die Konzentrationen im Well betragen 1,27 ng/ μ l (pECFP-hER β) bzw. 1,22 ng/ μ l (phER β -EYFP) Plasmid und 3,14 ng/ μ l (pECFP-hER β) bzw. 3,04 ng/ μ l (phER β -EYFP) Lipofectamine 2000. Der Anteil von OptiMEM I im Well betrug 15,7% (pECFP-hER β) bzw. 15,2% (phER β -EYFP).

Für die Untersuchung der schnellen, östrogeninduzierten Effekte auf die Rezeptorlokalisierung in-vivo wurde am folgenden Tag das Transfektionsmedium gegen Nährmedium mit Antibiotika und NGF gewechselt. Zwei Tage nach Transfektion fand die Stimulation der Zellen mit 10^{-8} M 17 β -Östradiol statt. Das Medium wurde durch Nährmedium mit NGF und Östradiol ersetzt.

Für die Analyse einer längeren Östrogeneinwirkung wurde bei den 24-Well-Platten ca. 5h nach der Transfektion das Medium gegen Nährmedium mit Antibiotikum, 50 pg/ μ l NGF und bei den Stimulationsgruppen auch 10^{-8} M 17 β -Östradiol gewechselt. Die Zellen wurden

weiter inkubiert und nach weiteren 24 h, 48 h oder 72 h fixiert. Bei letzteren Zellen wurde am zweiten Tag nach Stimulation noch einmal das Nährmedium erneuert.

Bei den für die Konfokalmikroskopie kultivierten Zellen in den Chamber Slides wurden mit pECFP-hER β transfizierte Zellen in sieben Gruppen eingeteilt (s. Tab. 2). Gruppe 1, 3 und 6 bestanden aus Zellen, die unstimuliert 24, 48 oder 72 Stunden nach Transfektion fixiert wurden. Bei den Zellen in Gruppe 2 und 4 fand 24 (Gruppe 2) bzw. 48 Stunden (Gruppe 4) nach Transfektion eine 30-minütige Stimulation mit 10^{-8} M 17 β -Östradiol statt. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Gruppe 5 und 7 wurden nach 24 (Gruppe 5) bzw. 48 Stunden (Gruppe 7) einer Stimulation mit Östradiol über 24 Stunden unterzogen und dann nach insgesamt 48 h (Gruppe 5) bzw. 72 h (Gruppe 7) fixiert.

Gruppe	t/h	E2	Anzahl der Bilder (N)
1	24	-	35
2		30 min	43
3	48	-	31
4		30 min	22
5		24 h	35
6	72	-	24
7		24 h	21

Tab. 2: Gruppen von ECFP-hER β exprimierenden Zellen für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen. Angegeben sind der Zeitraum von der Transfektion bis zur Fixation (t/h), die Dauer der Östradiolstimulation (E2) und die Anzahl der analysierten Bilder pro Gruppe (N).

Gruppe	t/h	Anzahl der Bilder (N)
1	24	39
2	48	51
3	72	40

Tab. 3: Gruppen von hER β -EYFP exprimierenden Zellen für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen. Angegeben sind der Zeitraum von der Transfektion bis zur Fixation (t/h) und die Anzahl der analysierten Bilder pro Gruppe (N).

Mit pHER β -EYFP transfizierte PC-12 Zellen wurden unstimuliert 24 h, 48 h oder 72 h nach Transfektion fixiert (s. Tab. 3).

4.2.13 RNA-Isolierung aus PC-12 Zellen (RNeasy Mini Kit)

Die Identität der transfizierten Vektoren wurde durch RT-PCR überprüft. Zunächst wurde RNA aus den fluoreszierenden PC-12 Zellen isoliert. Dies geschah mit Hilfe des RNeasy Kits. Als erstes wurden die Zellen mit 0,3 ml/Well 0,25% Trypsin/ 0,02% EDTA von den

24-Well-Platten gelöst. Sie wurden dann in Falcon Röhren mit 2 ml RPMI 1640 überführt und 5 min mit 1200 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 350 µl Puffer RLT (+1% β-Mercaptoethanol) resuspendiert und durch Gabe auf eine QIAshredder Column (in einem Collection Tube) 2 min bei 14 000 g homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat mit 70%igem Ethanol (Endkonzentration 35%) vermischt und auf eine RNeasy Mini Spin Column in einem Collection Tube gegeben. Nach 15 s Zentrifugation bei 8000 g folgte ein Waschgang mit 700 µl Puffer RW1 sowie weiteren 15 s Zentrifugation bei 8000 g. Danach wurde die Spin Column auf ein neues Collection Tube gesetzt und mit 500 µl Puffer RPE gewaschen. Der anschließenden Zentrifugation (15 s, 8000 g) folgte die erneute Zugabe von 500 µl RPE und eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 14 000 g. Nach Setzen der Spin Column in ein neues Tube wurde die RNA mit 50 µl RNasefreiem Wasser durch Zentrifugation für eine Minute bei 8000 g eluiert.

4.2.14 RT-PCR

Das Umschreiben der aus PC-12 Zellen isolierten RNA erfolgte durch Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Für die Konvertierung der RNA in cDNA wurden ca. 53 ng/µl isolierte RNA, 42 ng/µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ und dNTP mix (je 0,83 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP) vorsichtig gemischt. Der Inkubation bei 65 °C für 5 min folgte eine einminütige Inkubation auf Eis. Nach kurzem Sammeln in der Tischzentrifuge wurden 1x First-Strand Buffer, 2,1 U/µl RNaseOUT Inhibitor, sowie 10,5 mM DTT zugefügt und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde eine Minute bei 42 °C erhitzt und nach Zugabe von 10 U/µl SuperScript II RT 50 min bei 42 °C inkubiert. Darauf folgte das Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min. Die Proben wurden auf Eis gestellt und RNA für eine effizientere PCR durch Zugabe von 95 mU/µl RNaseH und Inkubation von 20 min bei 37 °C abgebaut. Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Amplifikation der cDNA wurden Ansätze bestehend aus sterilem dH₂O mit 1x DyNAzyme Buffer, dNTP Mix (je 0,2 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP), 2 pmol/µl Vorwärtsprimer bzw. 2 pmol/µl Rückwärtsprimer, ca. 33 ng/µl cDNA und 40 mU/µl DyNAzyme Polymerase F-500 gegeben. Als Vorwärtsprimer dienten EGFP-C-SEQ (Primer (12)) für ECFP-hERβ bzw. ER-beta-Ü3' (Primer (13)) für hERβ-EYFP. Die entsprechenden Rückwärtsprimer waren ER-beta-Ü5' (Primer (14)) für ECFP-hERβ und

EGFP-N-SEQ (Primer (11)) für hER β -EYFP. Kontrollen enthielten keine cDNA. Die Amplifikation lief nach folgendem Programm ab:

1.	95 °C	5 min	
2.	65°C	30 s	} 40 Zyklen
3.	72 °C	1 min	
4.	95 °C	1 min	
5.	72 °C	5 min	
6.	20 °C	Halten	

Die Deckeltemperatur des Thermocyclers betrug 100 °C. Die amplifizierten Fragmente wurden per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt oder unter Verwendung der Primer EGFP-N-SEQ (Primer (11), hER β -EYFP) bzw. EGFP-C-SEQ (Primer (12), ECFP-hER β) sequenziert (s. 4.2.9).

4.2.15 Fixierung der PC-12 Zellen

Die PC-12 Zellen in den 24-Well-Platten wurden mit 500 μ l 4% Paraformaldehyd 10 min fixiert und anschließend dreimal 5 min mit 500 μ l PBS gewaschen. Das PBS wurde im Well belassen und die Platten in Parafilm und Alufolie gewickelt bei 4 °C gelagert.

Die Zellen in den Chamber Slides wurden entsprechend mit den halben Volumina der Reagenzien behandelt.

4.2.16 Kernfärbung

Um zwischen nukleärer und extranukleärer Lokalisation der Fusionsproteine unterscheiden zu können, wurden die Zellkerne der PC-12 Zellen mit 2-(4-carbamimidoylphenyl)-1H-indol-6-carboximidamid (DAPI) gefärbt. Die Zellen auf den 24-Well-Platten wurden zunächst zweimal 5 min mit 500 μ l PBS gewaschen, 5 min mit 300 μ l DAPI (0,1 ng/ μ l) gefärbt, und hinterher dreimal mit PBS gewaschen. Zellen auf Chamber Slides wurden entsprechend mit 250 μ l PBS und 200 μ l DAPI behandelt. Die Kulturplatten wurden zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe vor Belichtung zwischendurch immer wieder mit einem Pappkarton

abgedunkelt. Nach der Färbung wurden die Kammern entfernt, DAKOCytomation Fluorescent Mounting Medium zugegeben und Deckgläser luftblasenfrei platziert. Die Aufbewahrung erfolgte mit Parafilm und Alufolie abgedichtet (24-Well-Platten) bzw. in alufolieumhüllten Präparatmappen (Chamber Slides) bei 4°C .

4.2.17 Konventionelle Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die PC-12 Zellen auf den 24-Well-Platten wurden mit dem Axiovert 100 Mikroskop im Hellfeld und mittels Exzitation im UV-Bereich und Fluoreszenzfiltern für ECFP (Filterset 47, BP 436 nm/20 nm, FT 455 nm, BP 480 nm/40 nm, Zeiss, Deutschland), EYFP (Filterset 46, BP 500 nm/20 nm, FT 515 nm, BP 535 nm/30 nm, Zeiss, Deutschland) und DAPI (Filterset 01, BP 365 nm/12 nm, FT 395 nm, LP 397 nm, Zeiss, Deutschland) betrachtet. Es wurden Bilder mit Hilfe einer Kamera (AxioCam HRc, Zeiss, Deutschland), PC, sowie dem Programm Axiovision (Zeiss, Deutschland) aufgenommen. Die Belichtung wurde innerhalb einer Versuchsreihe für ein Fusionsprotein, genau wie bei der Kernfärbung, konstant gehalten, so dass die aufgenommenen Bilder der Fusionsproteinfluoreszenz, genau wie die der Kernfärbung, bei der Auswertung untereinander vergleichbar waren. Es wurde so belichtet, dass ein Kompromiss zwischen z. T. sehr hell leuchtenden Zellkernen und häufig sehr schwach leuchtenden Zellen gefunden wurde. Von den fixierten Zellen wurden mit dem Objektiv für 20-fache Vergrößerung zufällige, über das jeweilige Well verteilte, Bereiche mit ca. 10-20 im ECFP- bzw. EYFP-Filterbild fluoreszierenden PC-12 Zellen ausgewählt, wobei am Rand des Wells liegende Zellgruppen zur Vermeidung von unspezifischen Lichteffekten des Wellrandes nicht berücksichtigt wurden. Auch Zellhaufen, bei denen aufgrund starker Konfluenz Überlagerungen bei Betrachtung mit dem DAPI-Filter auftraten, wurden nicht verwendet. Zu jedem Bild mit Fusionsproteinfluoreszenz wurde das entsprechende Bild der Kernfärbung gespeichert.

Die Analyse der schnellen, östrogeninduzierten Effekte erfolgte an lebenden Zellen. Mit dem Objektiv für 40-fache Vergrößerung wurden ausgewählte zytoplasmatisch fluoreszierende sowie umgebende Zellen beobachtet. Es wurde jeweils ein Hellfeld- und das zugehörige Fluoreszenzbild zur Detektion der Fusionsproteine erstellt. Auch hier wurde die Belichtung der Fluoreszenzbilder für jeden Versuch konstant gehalten. Die Zellen wurden mit 17 β -Östradiol stimuliert, indem das Nährmedium durch Nährmedium mit 10 nM

Östradiol ersetzt wurde. Im Anschluss wurden die eingestellten Zellen, wie oben beschrieben, nach 1, 6, 9, 15, 30, 45 und 60 min photographiert. Zusätzlich wurde vor und nach dem Versuch eine unstimulierte Kontrollgruppe aufgezeichnet.

4.2.18 Konfokalmikroskopie

Die konfokalmikroskopischen Bilder wurden mit einem Axiovert 200M Mikroskop mit dem Objektiv für 63-fache Vergrößerung erstellt. Die Exzitation der DAPI- bzw. Fusionsproteinfluoreszenz geschah mittels Enterprise- (Exzitation von 364 nm) bzw. Argon/2-Laser (Exzitation von 488 nm bei ECFP und 514 nm bei EYFP). Die Detektion der Fluoreszenzemission erfolgte bei 385-470 nm für DAPI, bei 505 nm für ECFP-hER β und bei 505-530 nm für hER β -EYFP. Die Steuerung der Kamera geschah durch die Software LSM 510 auf dem PC. Die Fluoreszenz von Fusionsprotein und DAPI-Färbung wurde in einem Bild festgehalten.

4.2.19 Morphometrische Analyse und Auswertung der Bilder

Die durch konventionelle Mikroskopie erhaltenen Bilder wurden mit der Software OpenLab auf Leuchtintensität und nukleäre oder extranukleäre (zytolasmathe) Verteilung von ECFP-hER β und hER β -EYFP untersucht. Bei der Messung wurde jeweils für das Bild der Fusionsproteinfluoreszenz und die Aufnahme der Kernfärbungsfluoreszenz eine Leuchtdichteschablone (Density Slice) erstellt, wobei die gewählte Sensitivität der Dichteschablone für sämtliche Aufnahmen einer Versuchsreihe (ECFP-hER β oder hER β -EYFP exprimierende Zellen) beibehalten wurde. Die Schablonen für korrespondierende Fusionsprotein- (Gesamtfluoreszenz) und Kernfärbungsbilder wurden durch eine boolesche UND-Operation verknüpft, so dass ein Density Slice für die Kernfluoreszenz entstand. Im Anschluss wurde für jedes Photo Gesamt- und Kernfluoreszenz gemessen. Bei Störsignalen in der DAPI-Färbung (blaue Wolken) wurde der entsprechende Teil des Bildes in den korrespondierenden Density Slices abgeschnitten. Inkongruente korrespondierende Bilder wurden nicht verwertet. Für jedes leuchtende Objekt eines Bildes wurde ein so genannter *Stain Index* ermittelt, welcher das Produkt aus Fläche des Objekts und seiner mittleren Leuchtintensität (relative Skala von 0-255) darstellt. Die Summe aller Leuchtindizes eines

Bildes wurde durch die Anzahl der Zellkerne eines Bildes geteilt um eine durchschnittliche Gesamt- bzw. Kernfluoreszenz zu erhalten. Die Kernzählung erfolgte anhand der Leuchtdichteschablone für die Kernfärbung. Unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS wurde für jede Behandlungsgruppe der Median der Gesamtfluoreszenzintensität als Maß für die Fusionsproteinexpression und des zytoplasmatischen Fluoreszenzanteils gemäß der Formel

$$\text{zytoplasmatische Fluoreszenzintensität} = \frac{\text{Gesamtfluoreszenzintensität} - \text{Kernfluoreszenzintensität}}{\text{Gesamtfluoreszenzintensität}}$$

als Maß für die nukleozytoplasmatische Verteilung ermittelt. Außerdem wurde durch SPSS im Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben die Signifikanz der Veränderung der Gesamtfluoreszenzintensität sowie der nukleozytoplasmatischen Verteilung mit der Zeit geprüft. Hierbei wurden zunächst die verschiedenen Zeitpunkte (unstimulierte Gruppen) paarweise miteinander verglichen und anschließend zu jedem Zeitpunkt die östradiolbehandelte Gruppe der unstimulierten Gruppe zum selben Zeitpunkt gegenübergestellt. Es wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ verwendet.

Bei den Messungen mit OpenLab musste für jeden Vektor die Intensität des Density Slices neu eingestellt werden, um eine möglichst genaue Analyse der nukleozytoplasmatischen Verteilung durchführen zu können. Dies hat jedoch zur Folge, dass die Ergebnisse zwischen den Fusionsproteinvarianten nur bedingt vergleichbar sind. Um die unterschiedliche Lokalisation beider Rezeptoren dennoch vergleichen zu können, schloss sich eine visuelle Auswertung der Bilder an. Hierbei wurde der Anteil der fluoreszierenden Zellen berechnet, die neben der nukleären Färbung auch Fluoreszenz im Zytoplasma aufwiesen. Genau wie die Ergebnisse der Messung mit OpenLab wurden die visuell ermittelten Werte einer Gruppe paarweise durch den Mann-Whitney-Test in Hinblick auf Verteilungsveränderungen mit der Zeit bzw. der Östrogenstimulation verglichen. Die entsprechenden Behandlungsgruppen von Zellen, die mit ECFP-hER β oder hER β -EYFP transfiziert worden waren, wurden dann auf Verteilungsunterschiede zwischen den beiden verschiedenen Fusionsproteinen untersucht.

5 ERGEBNISSE

5.1 Klonierung des hER β -Gens

Zur intrazellulären Lokalisation des humanen Östrogenrezeptors beta wurden PC-12 Zellen mit zwei rekombinanten Vektoren transfiziert, die jeweils das Gen für hER β kodieren. Bei dem ersten Vektor wurde das Gen für Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) an die Sequenz für den N-Terminus des Rezeptors gekoppelt. Der zweite Vektor kodiert für ein Fusionsprotein aus hER β und Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) am C-terminalen Ende des Rezeptors. Über die Detektion der Fluoreszenz konnte so die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren bestimmt werden.

5.1.1 Amplifikation des hER β -Gens

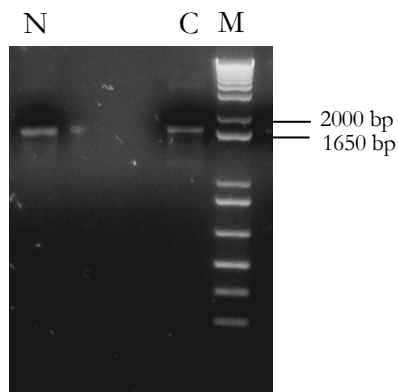


Abb. 9: Das Agarosegel weist zwei Banden von ca. 1700-1800 bp für attB-hER β -N (N) und -C (C) auf. M=Marker.

Zunächst musste das Gen für hER β amplifiziert und durch Anfügen der attB sites zur Einklonierung in den Donorvektor vorbereitet werden. Die attB-flankierten PCR-Produkte wurden im einprozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es waren für attB-hER β -C und attB-hER β -N je eine Bande von ca. 1700-1800 bp zu sehen (s. Abb. 9), was der vollständigen Länge des attB-flankierten hER β von 1666 bp (attB-hER β -C) bzw. 1651 bp (attB-hER β -N) entspricht.

5.1.2 Einklonierung von hER β in den Donorvektor

Die für hER β kodierende DNA wurde in den Donorvektor pDONR201 eingefügt, wodurch die so genannten Entryvektoren phER β -N und phER β -C erzeugt wurden. Die Identität von phER β wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Elektrophorese der Miniprep zeigte eine Bande von ca. 4 kbp für phER β -N und eine Bande von ca. 5-8 kbp für phER β -C (s. Abb. 10). Dies entspricht der errechneten Größe der Entryvektoren von 4 kbp.

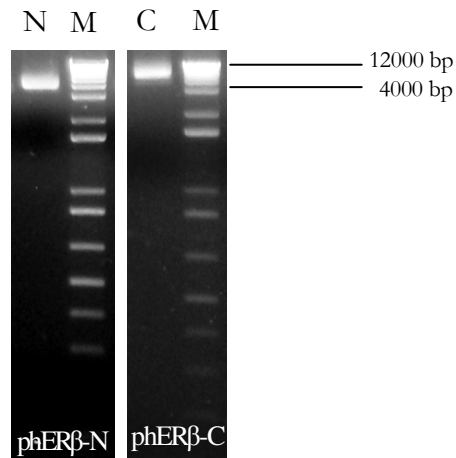


Abb. 10: In der Gelelektrophorese der Miniprep wurde eine DNA-Bande von ca. 4 kbp für phERβ-N (N, links) und von ca. 5-8 kbp für phERβ-C (C, rechts) gefunden. M=Marker.

Die durch Maxiprep erhaltenen Plasmide wurden anschließend durchsequenziert. Hierbei offenbarte sich in beiden Vektoren eine stumme Punktmutation an Position 1082, wodurch das Basentriplett GTG zu GTA geändert wurde. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Valin (Löffler 2001, s. Abb. 11).

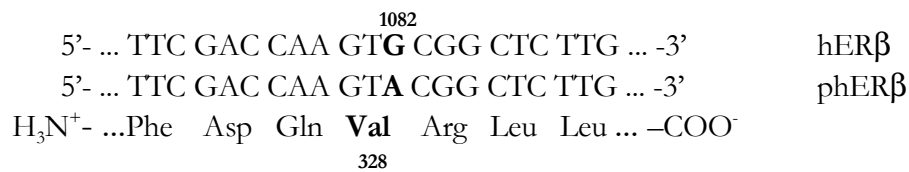


Abb. 11: Stumme Punktmutation in hERβ. Gegenüber der Originalsequenz (oben, Ogawa et al. 1998) ist in den beiden Entryvektoren phERβ-N und phERβ-C (Mitte) an Position 1082 (fett gedruckt) Guanin durch Adenin ausgetauscht. Sowohl das Triplett GTG, als auch GTA kodieren für die Aminosäure Valin (Löffler 2001; unten: zugehörige Aminosäuresequenz, an Aminosäureposition 328 befindet sich Valin).

In phERβ-C zeigte sich darüber hinaus die Mutation des Basentriplets TGC zu CGC an Position 150. Dies hat einen Aminosäureaustausch von Cystein gegen Arginin zur Folge (C18R, s. Abb. 12). Abb. 13 zeigt eine Übersicht über die Struktur von hERβ sowie die Lage des Aminosäureaustausches.

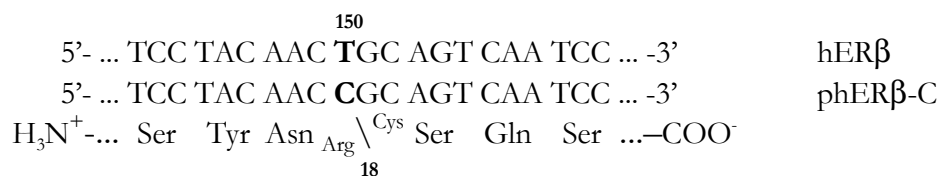


Abb. 12: Aminosäureaustausch in hERβ: An Position 150 ist in hERβ Thymin (Originalsequenz oben (Ogawa et al. 1998)) durch Cytosin (phERβ-C, Mitte) ausgetauscht. Das Basentriplett TGC ist also zu CGC mutiert, was einem Austausch der 18. Aminosäure von Cystein durch Arginin entspricht (unten).

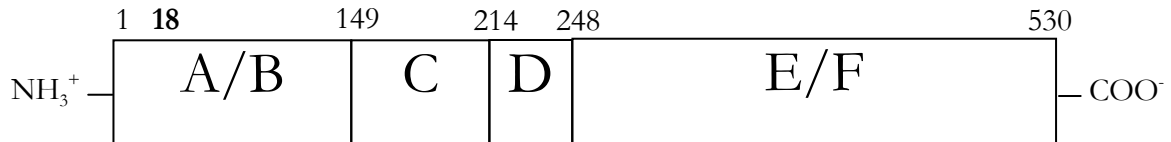


Abb. 13: Struktur von hER β : Der Aminosäureaustausch C18R (fettgedruckt) liegt in der N-terminalen A/B-Domäne, welche die Transaktivierungsfunktion 1 enthält. An die A/B-Domäne schließen sich die DNA-bindende Domäne C und die Scharnierregion D an. Am C-Terminus des Rezeptors liegt die ligandenbindende E/F-Domäne. Eine stumme Punktmutation in der für diesen Bereich kodierenden DNA-Sequenz führt zu keiner Veränderung dieser Domäne. Zahlen bezeichnen Aminosäuren (modifiziert nach Ogawa et al. 1998).

5.1.3 Einklonieren von hER β in die Zielvektoren

Zur Expression in PC-12 Zellen wurde hER β mittels Gateway-Technologie in die Zielvektoren pECFP und pdEYFP einkloniert, welche das Gen für ECFP bzw. EYFP (fluoreszierende Proteine) enthalten. Die Rekombination erfolgte zwischen phER β -N und pECFP einerseits, sowie zwischen phER β -C und pdEYFP andererseits. Es entstanden so die Expressionsvektoren pECFP-hER β , bei dem ECFP an den N-Terminus von hER β gekoppelt ist, und phER β -EYFP mit einer Fusion von EYFP und C-Terminus von hER β (s. Abb. 14).

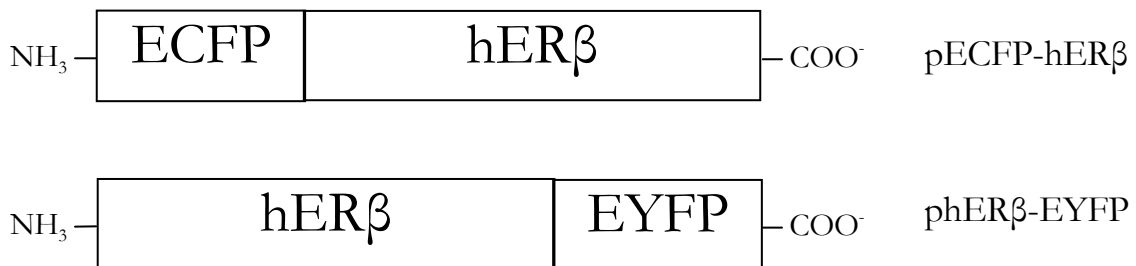


Abb. 14: Die Expressionsvektoren pECFP-hER β und phER β -EYFP. Bei pECFP-hER β (oben) ist ECFP an den N-Terminus von hER β gekoppelt. In phER β -EYFP (unten) ist EYFP mit dem C-Terminus von hER β fusioniert.

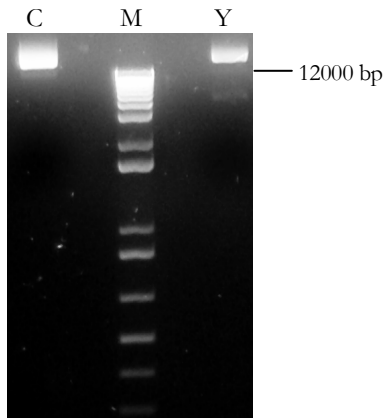


Abb. 15: Die durch Maxiprep isolierten Vektoren pECFP-hER β (C) und phER β -EYFP (Y) stellen sich als Banden von über 12 kbp dar. M=Marker.

Nach Vermehrung der Expressionsvektoren in DH5 α -Bakterien erfolgte die Aufreinigung der Plasmide durch Maxiprep. Die anschließende Agarosegelelektrophorese ergab Molekülgrößen von über 12 kbp, was die erwartete Größe von 6 kbp bei weitem übertrifft (s. Abb. 15).

Zur Analyse der Insertion von hER β im richtigen Leseraster, wurden die Fusionsregionen zwischen Rezeptorgen und dem jeweiligen EGFP-Variantengen sequenziert. Hierbei wurde die Korrektheit der acht verbleibenden Basen der attR1 Site von pECFP sowie des

attL1-Anteils aus phER β -N an der attB1 Site des entstandenen Expressionsvektors festgestellt (s. Abb. 16). Analog lag die korrekte Sequenz der 8 verbleibenden Basen der attR2 site von pEYFP und des attL2-Anteils aus phER β -C an der attB2 Site von phER β -EYFP vor (s. Abb. 17). Auch entsprachen mehr als die ersten (pECFP-hER β , s. Abb. 16) bzw. letzten (phER β -EYFP, s. Abb. 17) 220 Basenpaare des Gens für hER β der Originalsequenz.

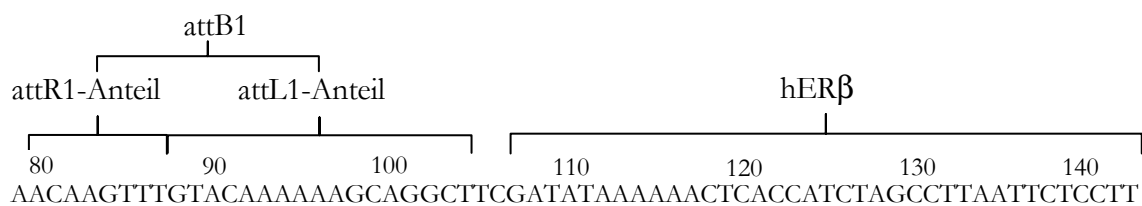


Abb. 16: Sequenz des Überganges zwischen ECFP und hER β . Die korrekte Sequenz des ehemaligen attR1-Anteils von pECFP sowie des ehemaligen attL1-Anteils aus phER β -N an der attB1 Site von pECFP-hER β sind genau wie die Basensequenz des Anfangs von hER β zu erkennen.

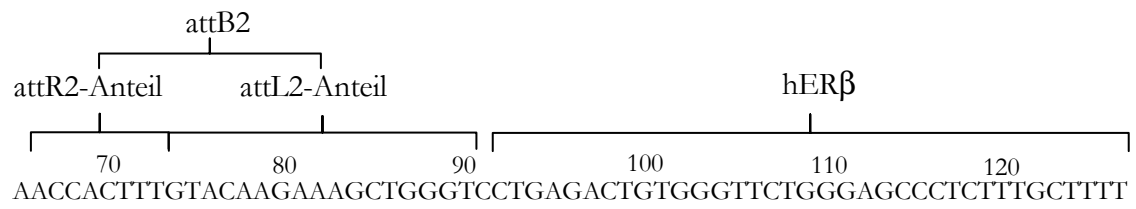


Abb. 17: Sequenz des Überganges zwischen EYFP und hERβ. Die korrekte Sequenz des ehemaligen attR2-Anteils von pdEYFP sowie des ehemaligen attL2-Anteils aus phERβ-C an der attB2 Site von phERβ-EYFP sind genau wie die Basensequenz des Endes von hERβ zu erkennen.

5.2 Expression von hER β in PC-12 Zellen

5.2.1 Überprüfung der Expression

Die erstellten Expressionsvektoren pECFP-hER β und phER β -EYFP wurden in PC-12 Zellen transfiziert. Im mikroskopischen Bild zeigten sich fluoreszierende Zellen. Zur Überprüfung, ob es sich bei den leuchtenden Fusionsproteinen tatsächlich um hER β handelte, wurde aus Kulturplatten mit leuchtenden Zellen mRNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt (s. Abb. 18). Es wurden fusionsproteinspezifische Primer verwendet. Das erste Primerpaar ergab spezifisch für ECFP-hER β ein ca. 350 bp großes Transkript (Bahn 4). Bei Verwendung des anderen Primerpaares zeigte sich spezifisch für hER β -EYFP ein Transkript von ca. 250 bp (Bahn 2). In nicht-transfizierten Zellen wurde bei Verwendung beider Primerpaare keine cDNA amplifiziert (Bahn 3: hER β -EYFP-spezifische Primer, Bahn 6: ECFP-hER β -spezifische Primer).

Primer für: hER β -EYFP ECFP-hER β

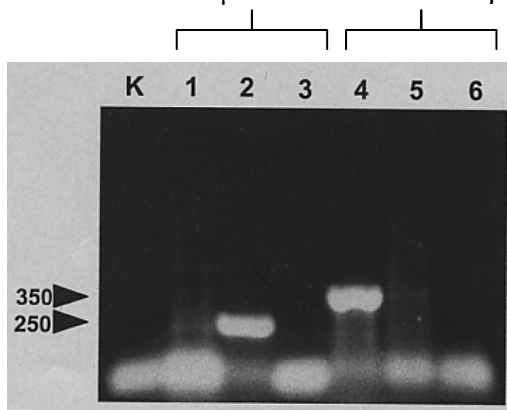


Abb. 18: Überprüfung der Transkription von ECFP-hER β und hER β -EYFP in PC-12 Zellen mittels RT-PCR: Unter Verwendung spezifischer Primer für hER β -EYFP (Bahn 1-3) zeigt sich in mit phER β -EYFP transfizierten Zellen eine Bande von ca. 250 bp (Bahn 2). In Proben aus pECFP-hER β transfizierten PC-12 Zellen ist keine Bande zu erkennen (Bahn 1). In diesen Zellen lässt sich jedoch mittels spezifischer Primer für ECFP-hER β ein ca. 350 bp großes Fragment nachweisen (Bahn 4). Dieselben Primer amplifizieren jedoch kein Transkript in Proben aus mit phER β -EYFP transfizierten PC-12 Zellen (Bahn 5). Extrakte aus nicht-transfizierten Zellen weisen weder bei Verwendung von hER β -EYFP-spezifischen Primern (Bahn 3), noch bei Verwendung von ECFP-hER β -spezifischen Primern (Bahn 6) eine Bande auf. K=Kontrolle ohne Zellextrakt.

Zur weiteren Analyse wurden amplifizierte DNA-Abschnitte sequenziert. Das Resultat war im Falle von ECFP-hER β die korrekte Sequenz des Abschnittes von hER β sowie des aus phER β -N stammenden attL1-Anteils an attB1 und der letzten acht Basenpaare des attR1-Anteils von pDECFP. Analog zeigte sich für hER β -EYFP zusätzlich zur Sequenz von hER β die korrekte Basenfolge des attL2-Anteils aus phER β -C und des attR2-Anteils von pDEYFP.

5.2.2 Fluoreszenzintensität und nukleozytoplasmatische Verteilung

Bei mit pECFP-hER β transfizierten Zellen zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch eine fast ausschließlich nukleäre Verteilung von ECFP-hER β (s. Abb. 19, Abb. 20). In Abb. 19 erkennt man im Vergleich der Hellfeldaufnahme (A) und der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (B), dass ungefähr ein Drittel der Zellen transfiziert war. In der Überlagerung des Hellfeldbildes und der Fluoreszenzaufnahme (C) erkennt man die nukleäre Lokalisation der Fluoreszenz. Zur Verifizierung dieser Beobachtung wurde eine Fluoreszenzmikroskopie angeschlossen, in welcher der Kernfarbstoff DAPI verwendet wurde. Abb. 20 zeigt die

PC-12 Zellen mit ECFP-hER β transfiziert

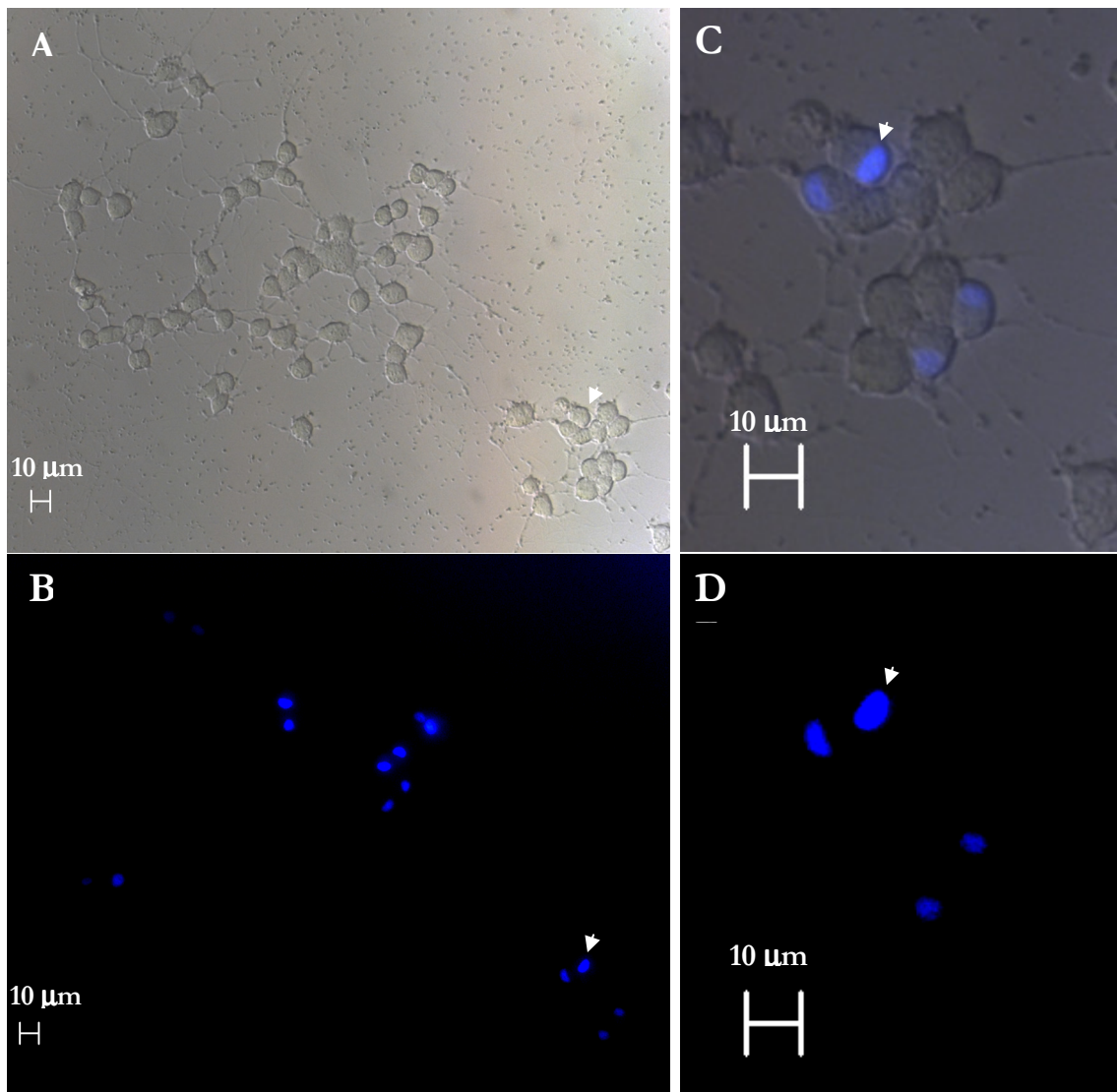


Abb. 19: In transfizierten PC-12 Zellen ist ECFP-hER β hauptsächlich nukleär zu finden. Pfeilköpfe zeigen auf Beispiele für nukleäre Fusionsproteine (A: Hellfeld, B: zugehöriges Fluoreszenzbild, D: Ausschnitt aus dem Fluoreszenzbild, Zellgruppe am rechten unteren Bildrand. C: Überlagerung mit korrespondierendem Hellfeldbild).

Fluoreszenz des Fusionsproteins ECFP-hER β (A) und des Kernfarbstoffes DAPI (B). Man erkennt deutlich, dass in der Aufnahme alle ECFP-hER β exprimierenden Zellen eine nukleäre Expression aufweisen und alle angefärbten Zellkerne (s. Abb. 20 A) auch in der DAPI-Färbung (s. Abb. 20 B) zu sehen sind.

PC-12 Zellen mit ECFP-hER β transfiziert (A) und DAPI-gefärbt (B)

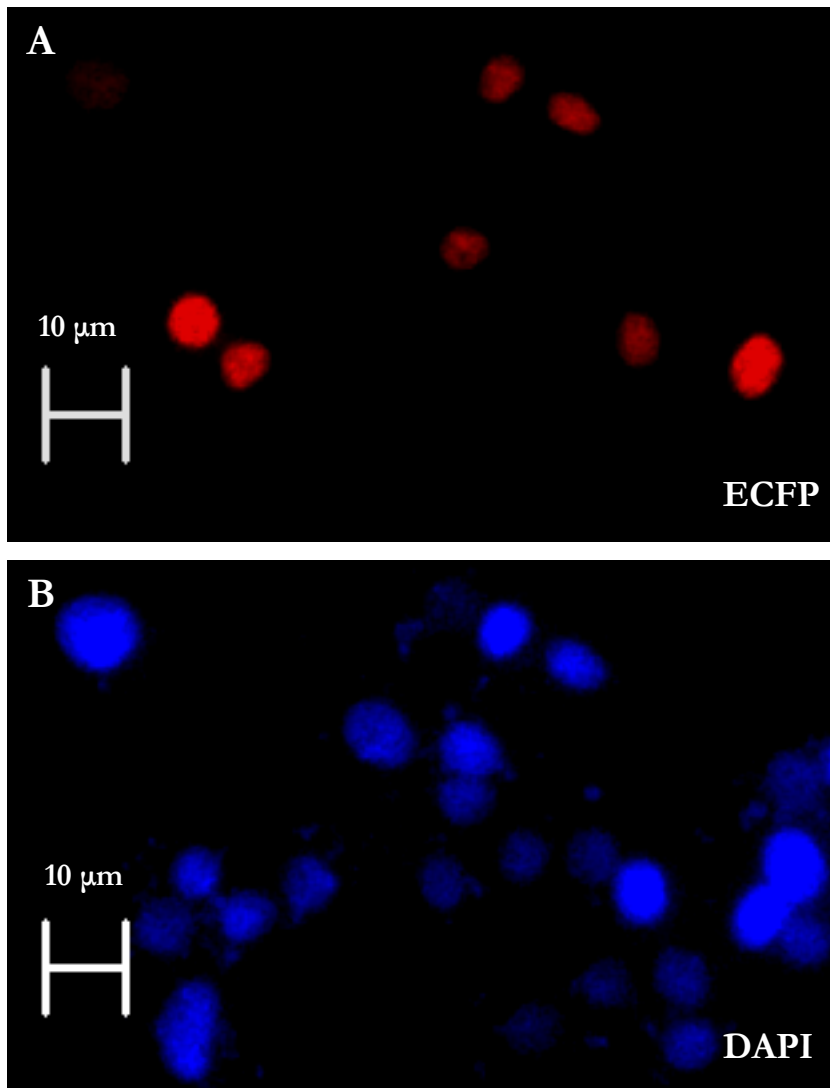


Abb. 20: Bei den mit pECFP-hER β transfizierten PC-12 Zellen (A) sind, wie im Vergleich mit der DAPI-Kernfärbung (B) zu erkennen ist, die Fusionsproteine nukleär lokalisiert. Alle ECFP-hER β exprimierenden Zellkerne in A sind auch in der DAPI-Färbung (B) zu sehen. Zur besseren Übersicht sind die ECFP-hER β exprimierenden Kerne rot dargestellt (Änderung der Farbe mit Adobe Photoshop).

Für hER β -EYFP ergab sich ebenfalls eine Transfektionseffizienz von ca. einem Drittel (s. Abb. 21 A und B). Hier fand sich jedoch neben einer nukleären Expression des Fusionsproteins (s. Abb 21 C, Pfeilkopf) auch eine zytoplasmatische Lokalisation (s. Abb. 21 C+D und 22 C+D, Pfeile). Die beschriebenen Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt. Daraufhin wurde die Verteilung der exprimierten Fusionsproteine in den PC-12 Zellen untersucht.

PC-12 Zellen mit hER β -EYFP transfiziert

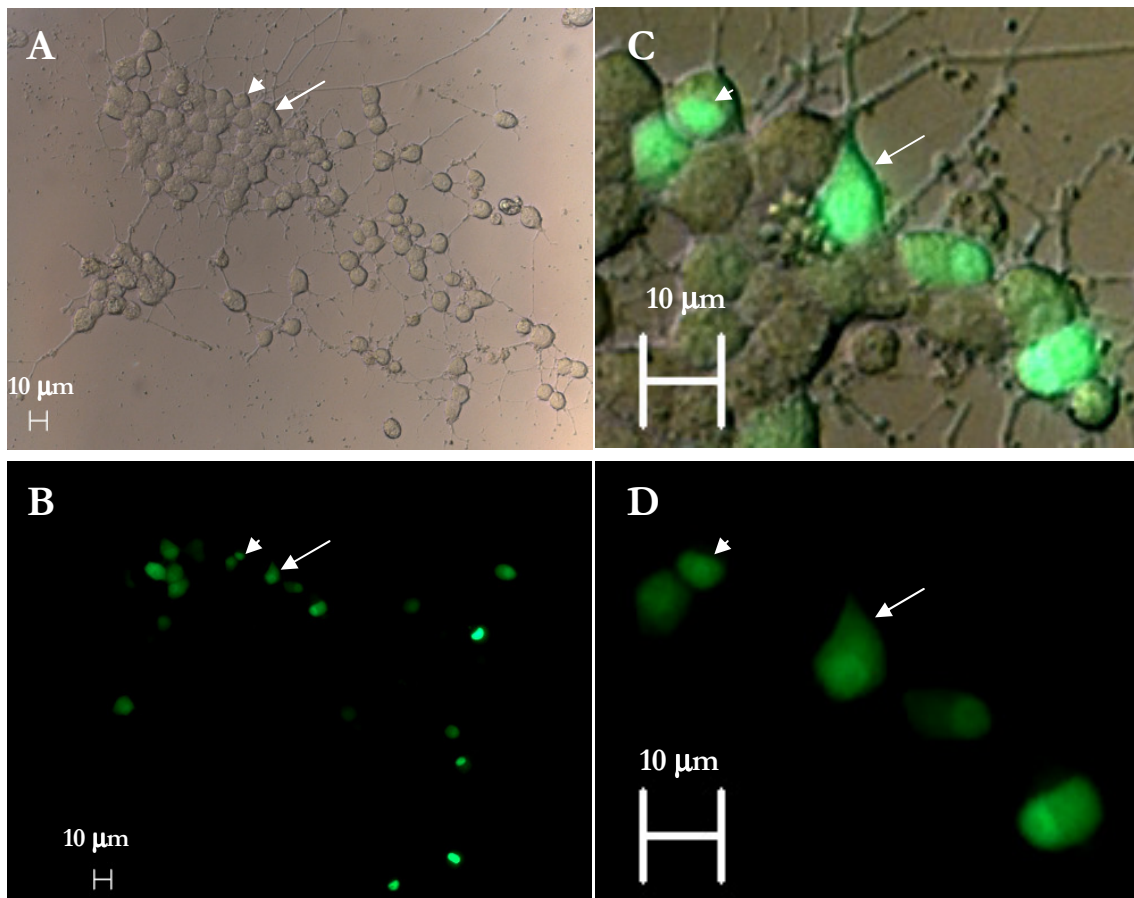


Abb. 21: In mit pHER β -EYFP transfizierten PC-12 sind Fusionsproteine im Zellkern (Pfeilköpfe) und auch im Zytoplasma zu beobachten (Pfeile; A: Hellfeld, B: zugehöriges Fluoreszenzbild, D: Ausschnitt aus dem Fluoreszenzbild. C: Überlagerung des Ausschnittes mit korrespondierendem Hellfeldbildausschnitt).

PC-12 Zellen mit hER β -EYFP transfiziert (A, C, D) und DAPI-gefärbt (B+D)

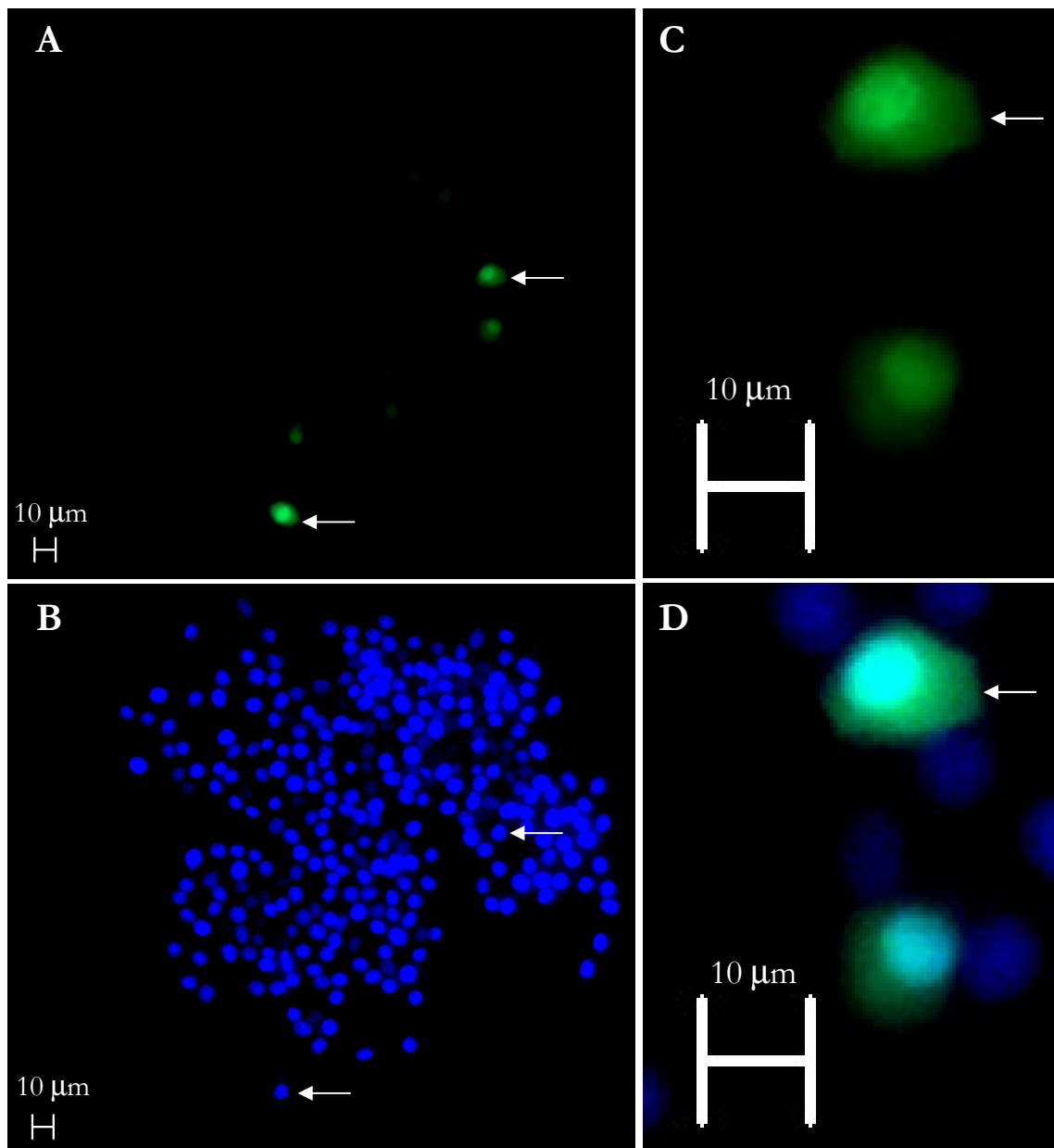


Abb. 22: Bei den hER β -EYFP synthetisierenden Zellen sind auch gemischt nukleozytoplasmatische Färbungen zu beobachten (Pfeile). A: hER β -EYFP, B: DAPI, C: Ausschnitt aus A, Zellgruppe rechts der Mitte, D: Übereinanderlagerung mit dem korrespondierenden DAPI-Ausschnitt.

Fusionsprotein	Fusion (hER β)	Fluoreszenzmuster	
		nukleär	zytoplasmatisch
ECFP-hER β	N-Terminal	+	kaum
hER β -EYFP	C-Terminal	+	+

Tab. 4: ECFP-hER β ist fast ausschließlich nukleär lokalisiert. Dagegen befindet sich hER β -EYFP in Zellkern und Zytoplasma.

5.2.2.1 *Analyse der Fluoreszenzintensität*

5.2.2.1.1 *ECFP-hER β*

Die Verteilung der Fusionsproteine wurde in den PC-12 Zellen mittels computergestützter Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierfür wurden Bilder aufgenommen und auf diesen durch die Software OpenLab die Intensität der gesamten Fluoreszenz der Zellen sowie die Intensität im Zellkern bzw. Zytoplasma ermittelt.

Die so gewonnenen Indizes für Gesamtfluoreszenzintensität und Fluoreszenzintensität im Zytoplasma wurden durch die Anzahl der Zellen pro Bild geteilt und so als Mittelwerte pro Zelle berechnet. Verglichen wurden Gesamtfluoreszenzintensität und zytoplasmatische Fluoreszenzintensität bei Zellen, die fünf Stunden nach der Transfektion für 24h, 48h oder 72h mit 17 β -Östradiol stimuliert und anschließend fixiert worden waren. Unstimulierte Zellen wurden entsprechend lang ohne Östradiol inkubiert und dann fixiert.

Für ECFP-hER β ergab die Analyse mit OpenLab weder für die Gesamtfluoreszenzintensität (s. Abb. 23), noch für den Anteil zytoplasmatisch fluoreszierender Zellen an der Gesamtfluoreszenzintensität (s. Abb. 24) einen signifikanten Unterschied. Dies gilt sowohl für den Vergleich unstimulierter PC-12 Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden als auch für die paarweise Gegenüberstellung von stimulierten und unstimulierten Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt.

ECFP-hER β : Gesamtfluoreszenzintensität

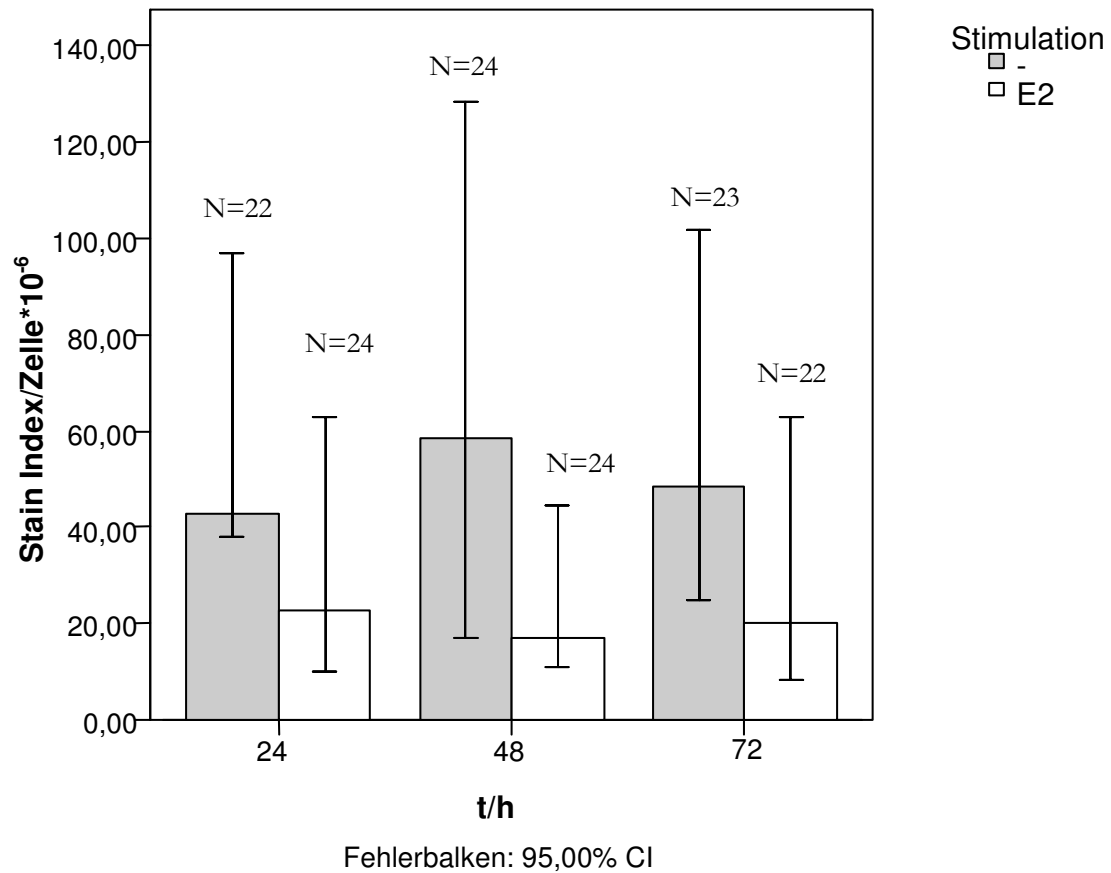


Abb. 23: ECFP-hER β : Gesamtfluoreszenzintensität pro Zelle. 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit Östradiol (E2) wurde der Stain Index/Zelle als Maß für die Fluoreszenzintensität berechnet. Es sind die Mediane aus vier Versuchen dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen das 95%-Konfidenzintervall des Medianes (95,00% CI). Nicht-hormonbehandelte Gruppen von Zellen sind als graue Balken, östradiolstimulierte als weiße Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. N= Anzahl der untersuchten Bilder.

ECFP-hER β : Zytoplasmatische Fluoreszenzintensität

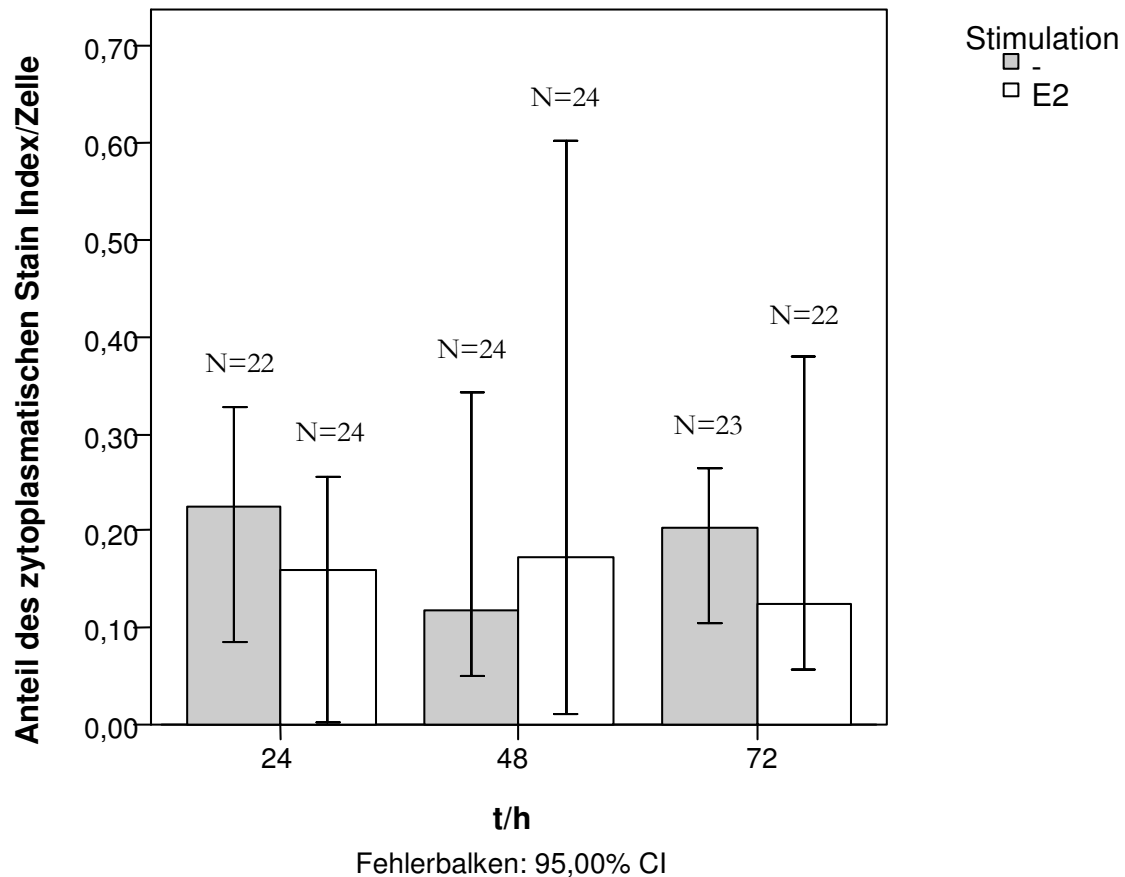


Abb. 24: ECFP-hER β : Anteil der zytoplasmatischen Fluoreszenzintensität an der Gesamtfluoreszenzintensität pro Zelle. 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit Östradiol (E2) wurde der Stain Index/Zelle als Maß für die Fluoreszenzintensität berechnet. Die Differenz zwischen Gesamtfluoreszenzintensität und nukleärer Fluoreszenzintensität pro Zelle wurde durch die Gesamtfluoreszenzintensität geteilt. Es sind die Mediane aus vier Versuchen dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen das 95%-Konfidenzintervall des Medianes (95,00% CI). Nicht-hormonbehandelte Gruppen von Zellen sind als graue Balken, östradiolstimulierte als weiße Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. N= Anzahl der untersuchten Bilder.

5.2.2.1.2 hER β -EYFP

Bei den mit hER β -EYFP transfizierten Zellen zeigten sich hinsichtlich Gesamtfluoreszenzintensität (s. Abb. 25) und zytoplasmatischem Anteil an der Fluoreszenzintensität (s. Abb. 26) keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

hER β -EYFP: Gesamtfluoreszenzintensität

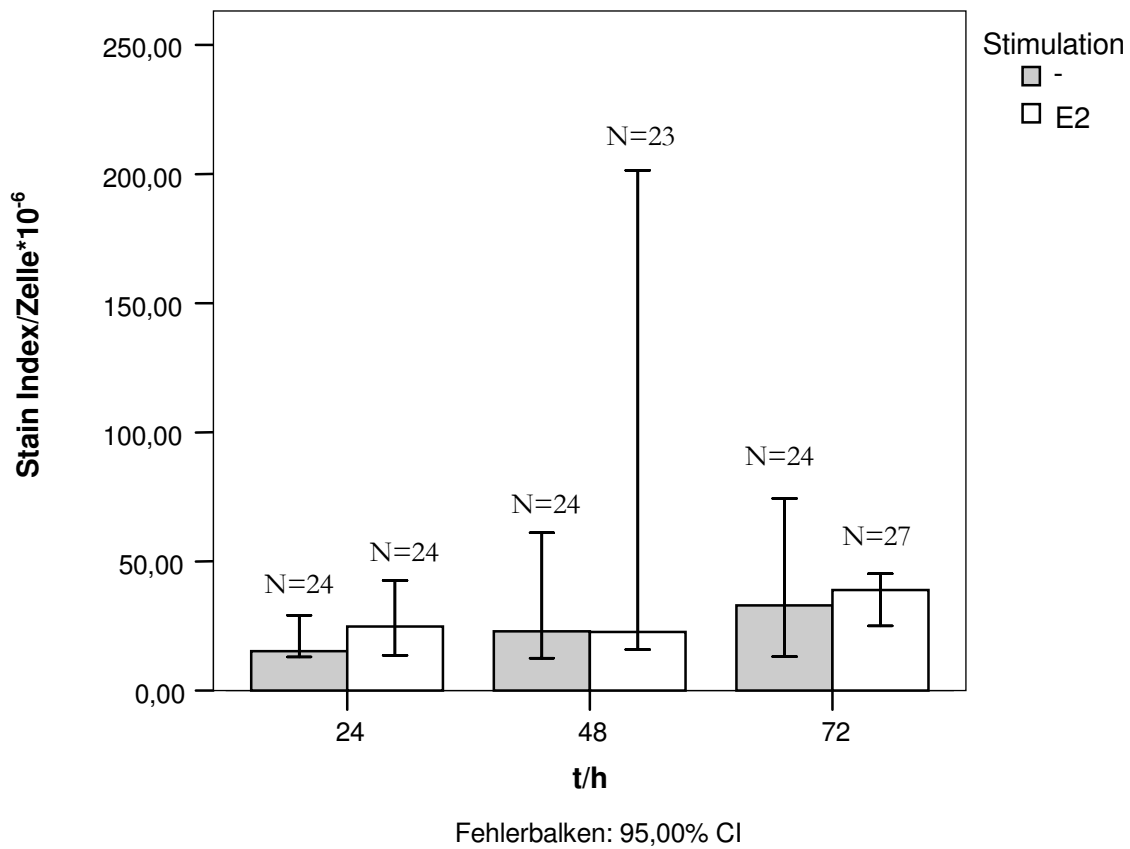
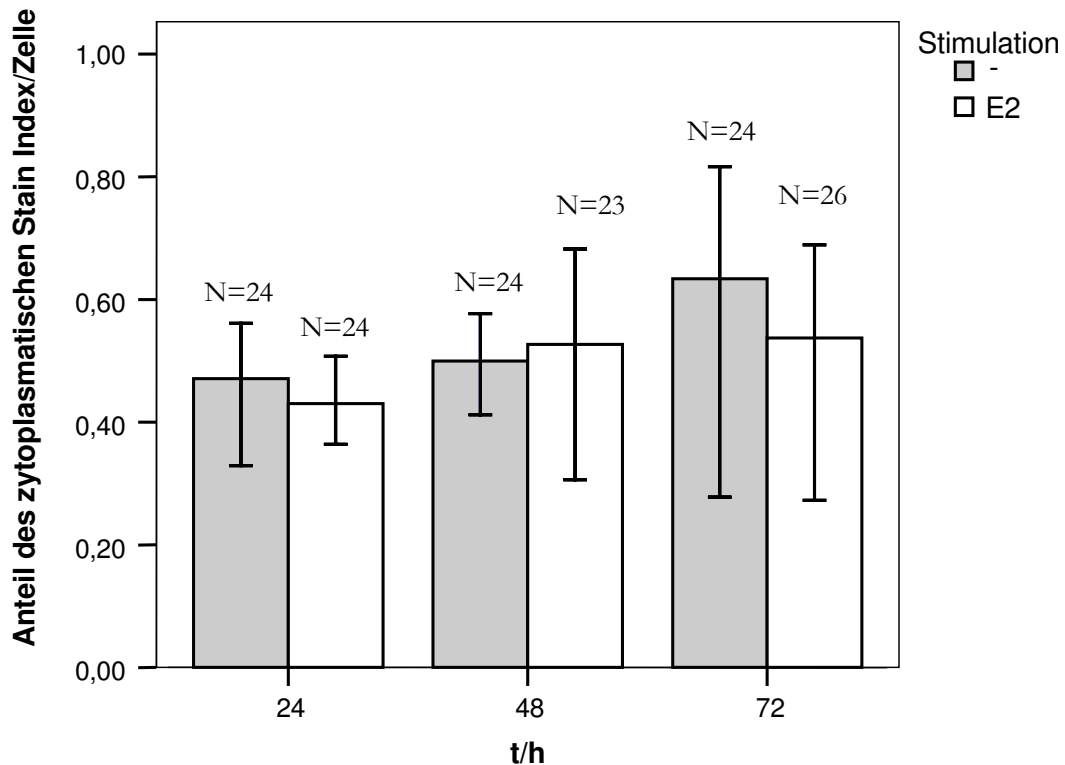


Abb. 25: hER β -EYFP: Gesamtfluoreszenzintensität pro Zelle. 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit Östradiol (E2) wurde der Stain Index/Zelle als Maß für die Fluoreszenzintensität berechnet. Es sind die Mediane aus vier Versuchen dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen das 95%-Konfidenzintervall des Medianes (95,00% CI). Nicht-hormonbehandelte Gruppen von Zellen sind als graue Balken, östradiolstimulierte als weiße Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. N= Anzahl der untersuchten Bilder.

hER β -EYFP: Zytoplasmatische Fluoreszenzintensität



Fehlerbalken: 95,00% CI

Abb. 26: hER β -EYFP: Anteil der zytoplasmatischen Fluoreszenzintensität an der Gesamtfluoreszenzintensität pro Zelle. 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit Östradiol (E2) wurde der Stain Index/Zelle als Maß für die Fluoreszenzintensität berechnet. Die Differenz zwischen Gesamtfluoreszenzintensität und nukleärer Fluoreszenzintensität pro Zelle wurde durch die Gesamtfluoreszenzintensität geteilt. Es sind die Mediane aus vier Versuchen dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen das 95%-Konfidenzintervall des Medianes (95,00% CI). Nicht-hormonbehandelte Gruppen von Zellen sind als graue Balken, östradiolstimulierte als weiße Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. N= Anzahl der untersuchten Bilder.

5.2.2.2 Visuelle Auswertung

Um die unterschiedliche Lokalisation beider Rezeptoren vergleichen zu können, schloss sich eine visuelle Auswertung der Bilder an. Hierbei wurde der Anteil der fluoreszierenden Zellen berechnet, die neben der nukleären Färbung auch Fluoreszenz im Zytoplasma aufwiesen.

5.2.2.2.1 ECFP-hER β

Bei der N-terminalen Fusionsvariante wies nur ein sehr geringer Anteil von Zellen eine zytoplasmatische Fluoreszenz auf. In weniger als 10% der transfizierten Zellen war eine zytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine zu sehen. Darüberhinaus konnte keine Änderung der nukleozytoplasmatischen Verteilung beobachtet werden. Weder im Vergleich der unbehandelten Zellgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten, noch im Vergleich zwischen stimulierten und unbehandelten Zellen zur selben Zeit waren signifikante Unterschiede zu finden (s. Abb. 27).

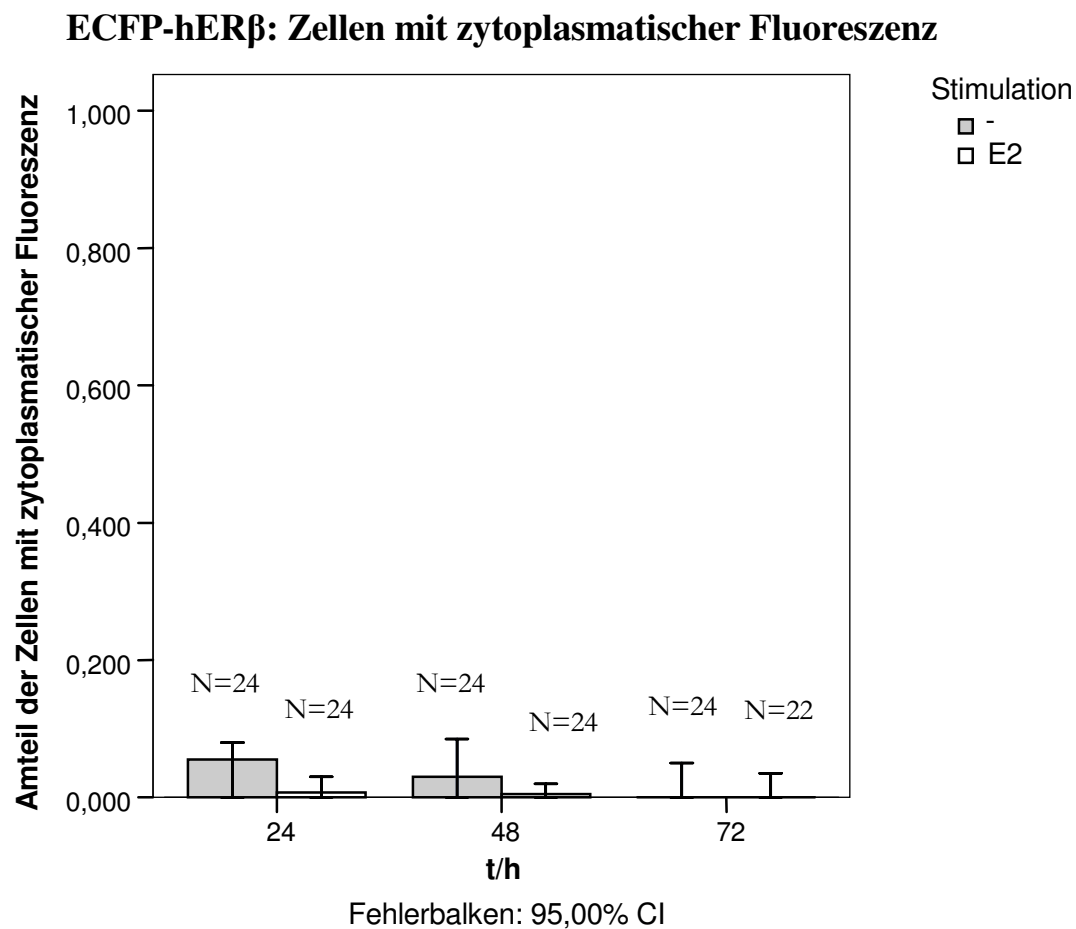


Abb. 27: ECFP-hER β : Anteil der Zellen mit zytoplasmatischer Fluoreszenz an den transfizierten fluoreszierenden Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit Östradiol (E2). Es sind die Mediane aus vier Versuchen dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen das 95%-Konfidenzintervall des Medianes (95,00% CI). Nicht-hormonbehandelte Gruppen von Zellen sind als graue Balken, östradiolstimulierte als weiße Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. N= Anzahl der untersuchten Bilder.

5.2.2.2.2 hER β -EYFP

Die C-terminale Fusionsvariante des Rezeptors zeigte neben Zellen mit nukleärer Fluoreszenz auch einen Anteil an Zellen mit zytoplasmatischer Lokalisation des Fusionsproteins. Auch hier ergaben sich jedoch keine signifikanten Veränderungen des Anteils von Zellen mit zytoplasmatischen, fluoreszierenden Östrogenrezeptoren zu verschiedenen Zeitpunkten oder durch Östrogenstimulation (s. Abb. 28). Die zytoplasmatische Fluoreszenz blieb über den gesamten Zeitraum konstant erhalten.

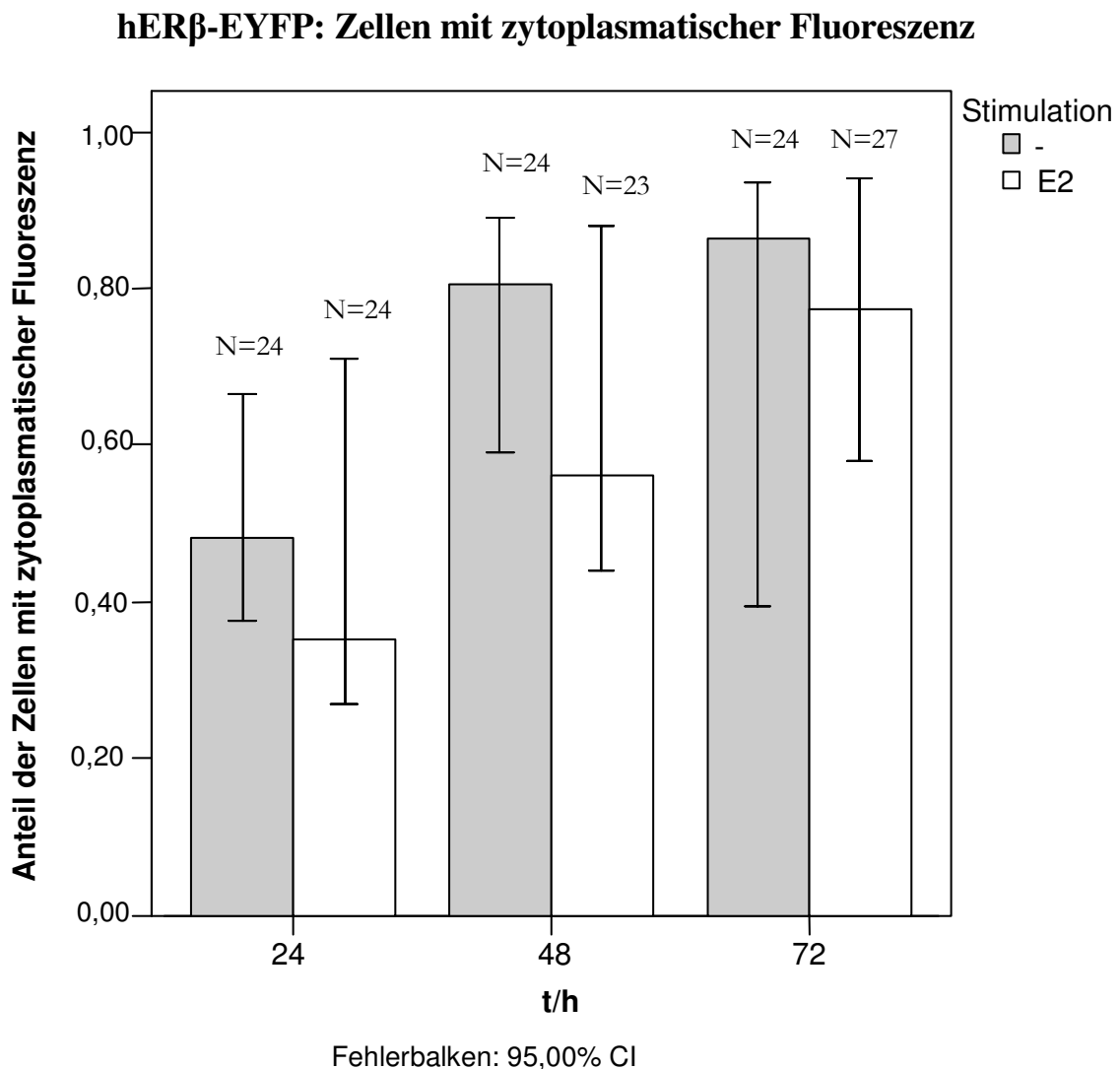


Abb. 28: hER β -EYFP: Anteil der Zellen mit zytoplasmatischer Fluoreszenz an den transfizierten fluoreszierenden Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit Östradiol (E2). Es sind die Mediane aus vier Versuchen dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen das 95%-Konfidenzintervall des Medianes (95,00% CI). Nicht-hormonbehandelte Gruppen von Zellen sind als graue Balken, östradiolstimulierte als weiße Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. N= Anzahl der untersuchten Bilder.

5.2.2.2.3 Vergleich von ECFP-hER β und hER β -EYFP

Das zelluläre Verteilungsmuster der beiden Fusionsproteine wurde verglichen. Hierzu wurden einander östradiol-stimulierte bzw. unstimulierte Zellgruppen mit identischer Kultivierungsdauer und Behandlung (mit oder ohne Östradiol) gegenüber gestellt. Wie aus Abb. 29 ersichtlich, wiesen die mit pECFP-hER β transfizierten PC-12 Zellen lediglich einen geringen Anteil hER β im Zytoplasma auf, wohingegen hER β -EYFP exprimierende Zellen zu einem großen Anteil zytoplasmatisch lokalisierte Fusionsproteine präsentierten. In allen korrespondierenden Gruppen wiesen mit hER β -EYFP transfizierte Zellgruppen einen signifikant höheren Anteil an Zellen mit zytoplasmatischer Fluoreszenz auf (jeweils $p=0,029$;

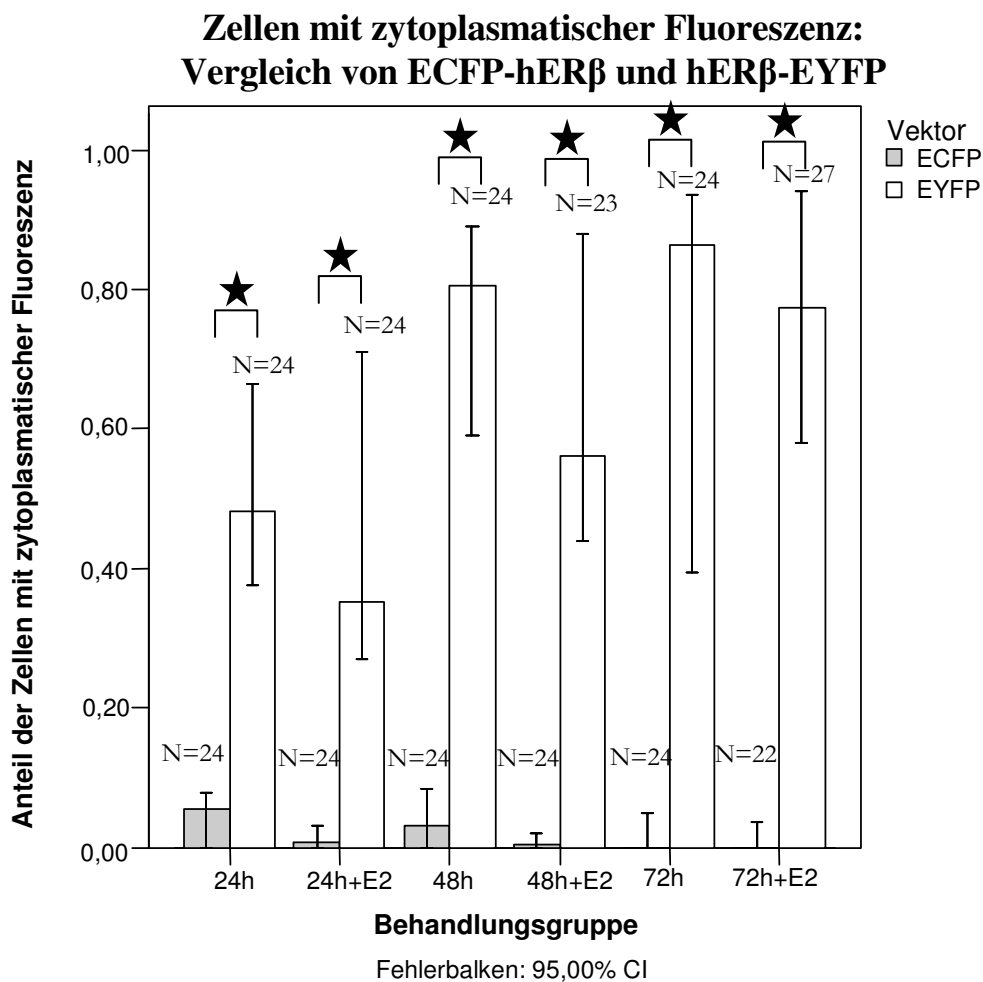


Abb. 29: Anteil der Zellen mit zytoplasmatischer Fluoreszenz an den fluoreszierenden PC-12 Zellen: Vergleich der Lokalisation von ECFP-hER β und hER β -EYFP. Die entsprechenden Gruppen von ECFP-hER β (ECFP, grau) und hER β -EYFP (EYFP, weiß) exprimierenden Zellen sind zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils ohne und mit Östradiolstimulation einander gegenüber gestellt. Es sind die Mediane aus vier Versuchen dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen das 95%-Konfidenzintervall des Medianes (95,00% CI). Zwischen allen korrespondierenden Gruppen beider Vektoren bestehen signifikante Unterschiede zum Niveau $\alpha=0,05$ (Sternchen). N= Anzahl der untersuchten Bilder.

s. Abb. 29).

Weder in hER β -EYFP exprimierenden Zellen, noch in mit ECFP-hER β transfizierten PC-12 Zellen waren membranöse Fluoreszenzmuster zu beobachten.

5.2.3 Konfokalmikroskopie

Die intrazelluläre Verteilung der Fusionsproteine (s. Tab. 5) wurde auch auf konfokalmikroskopischen Bildern untersucht. In ECFP-hER β exprimierenden Zellen zeigte sich eine sehr schwache punktförmige Verteilung im Zytoplasma bei größtenteils ausgespartem Zellkern. Einige Zellen wiesen jedoch stark fluoreszierende Zellkerne auf. Das Fluoreszenzmuster war hierbei ebenfalls punktförmig bis flächenhaft (s. Abb. 30 A+B). Bei PC-12 Zellen, die 24 Stunden mit Östradiol behandelt und nach 48 Stunden fixiert worden waren, fand sich jedoch bei ca. einem Viertel der Kerne, im Unterschied zu den nur 30 min stimulierten Zellen, ein gröberes, schollenartiges Muster im Nukleus (s. Abb. 31). Dieses Muster war bei der unstimulierten und 30 min stimulierten 24h-Gruppe nicht zu erkennen. Auch bei der unbehandelten 48h-Gruppe zeigte sich dieses Kernfluoreszenzmuster nicht. In den 72h-Gruppen wiesen wiederum die 24 Stunden stimulierten Kulturen das schollenartige Kernmuster auf. Ungefähr ein Drittel der leuchtenden Kerne zeigte die beschriebene Verteilung.

Fusionsprotein	Fusion (hER β)	Fluoreszenzmuster	
		Zellkern	Zytoplasma
ECFP-hER β	N-Terminal	z. T. granulär/ schollig	sehr schwach
hER β -EYFP	C-Terminal	ausgespart	stark, granulär

Tab. 5: Lokalisation der Fusionsproteine (Konfokalmikroskopie). ECFP-hER β zeigt ein sehr schwaches zytoplasmatisches aber z. T. starkes, granuläres oder scholliges Kernmuster. Bei hER β -EYFP ist der Zellkern ausgespart. Das Zytoplasma ist dagegen stark granulär gefärbt.

**PC-12 Zellen mit ECFP-hER β (östradiolstimuliert, A+B)
und mit hER β -EYFP (unstimuliert, C+D) transfiziert**

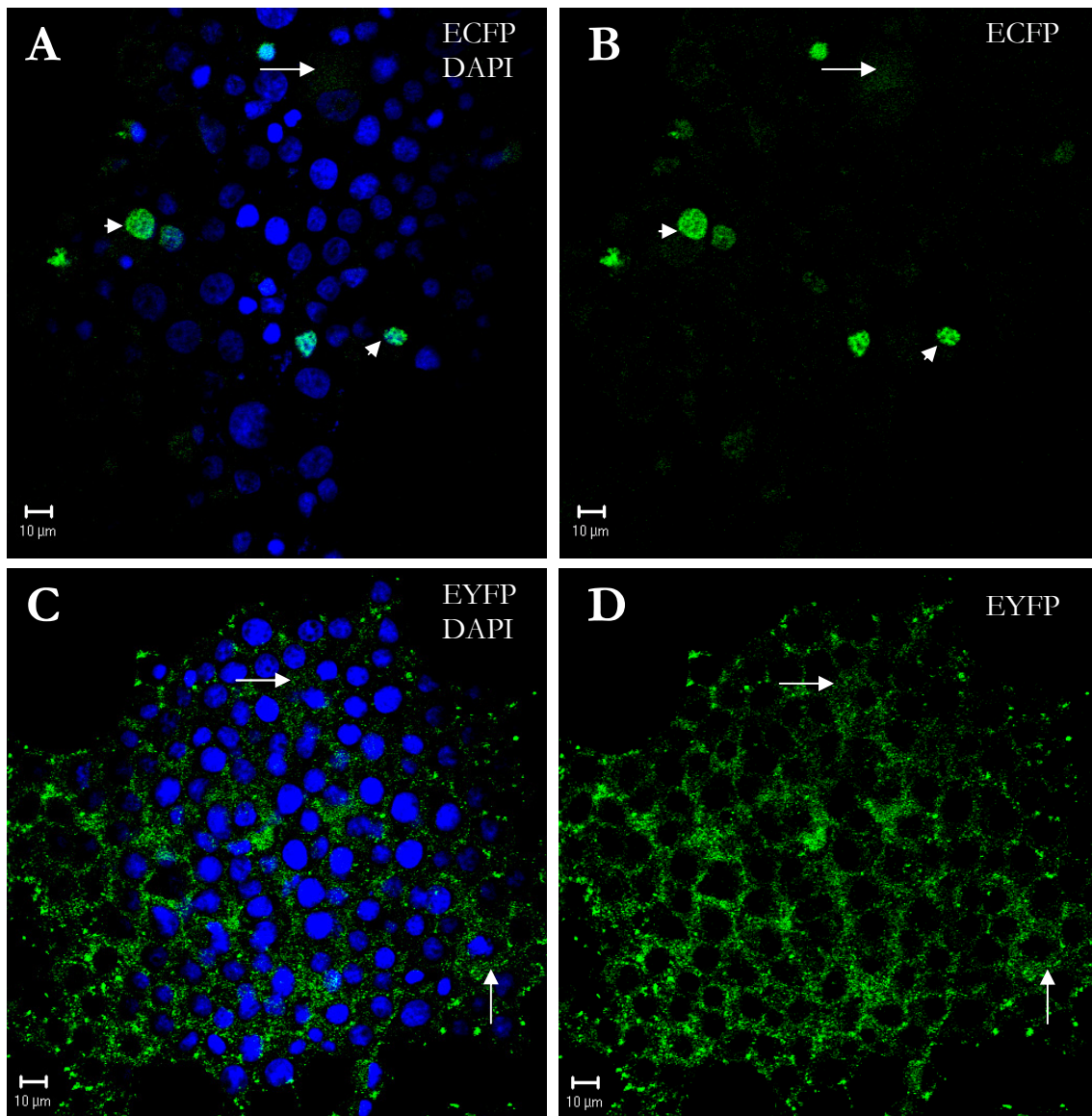


Abb. 30: Im konfokalmikroskopischen Bild zeigt sich für ECFP-hER β bei Östradiolstimulation (A: ECFP und DAPI, B: nur ECFP) genau wie unstimuliert eine nukleäre (Pfeilspitzen) und schwach zytoplasmatische Verteilung (Pfeile). hER β -EYFP (C: EYFP und DAPI, D: nur EYFP) ist unstimuliert hauptsächlich stark zytoplasmatisch lokalisiert (Pfeile).

hER β -EYFP exprimierende PC-12 Zellen wiesen eine deutlich intensivere punktförmige Fluoreszenzfärbung des Zytoplasma auf (s. Abb. 30 C+D und Abb. 32). Der Zellkern war fast vollständig ausgespart. Die wenigen fluoreszierenden Kerne zeigten ein punktförmiges Muster, das schollige Fluoreszenzmuster wurde nicht gesehen (s. Abb. 32).

ECFP-hER β -transfizierte PC-12 Zellen, östradiolstimuliert

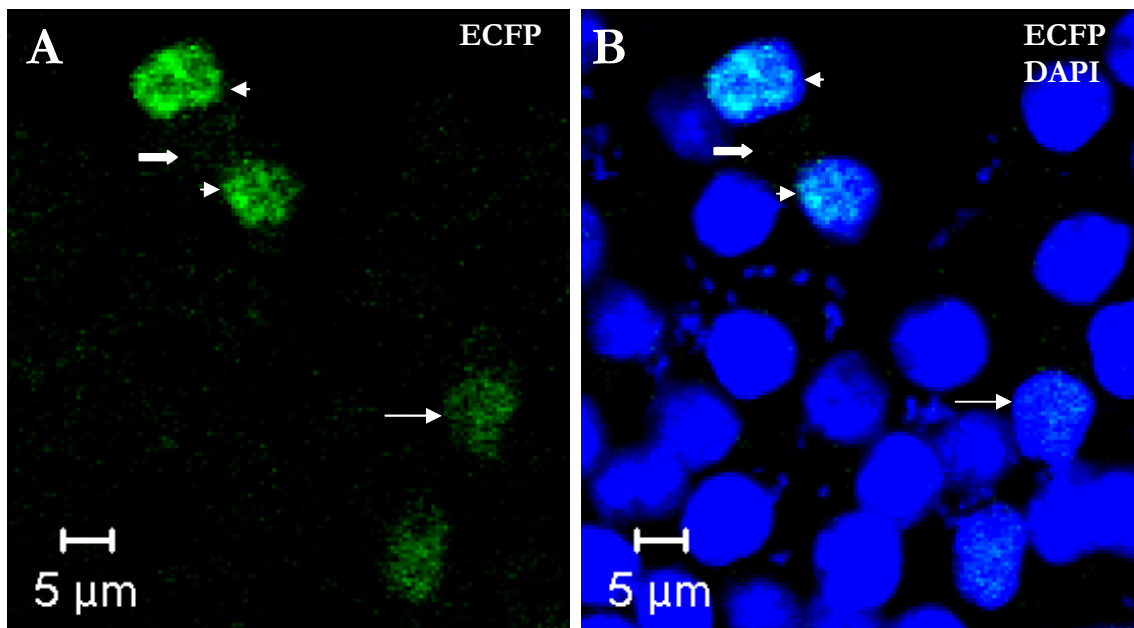


Abb 31: 48 Stunden nach Transfektion: In ECFP-hER β exprimierenden Zellen, die 24 Stunden mit E2 stimuliert wurden, zeigt sich eine hauptsächlich nukleäre Verteilung des Fusionsproteins. Neben fein punktierten Nuklei (dünne Pfeile) finden sich auch Zellkerne mit einem groben, scholligen Aussehen (Pfeilspitzen). Das Zytoplasma ist nur sehr schwach punktförmig gefärbt (dicke Pfeile). A: Fluoreszenz des Fusionsproteins, B: Überlagerung mit der DAPI-Färbung).

hER β -EYFP-transfizierte PC-12 Zellen, unstimuliert

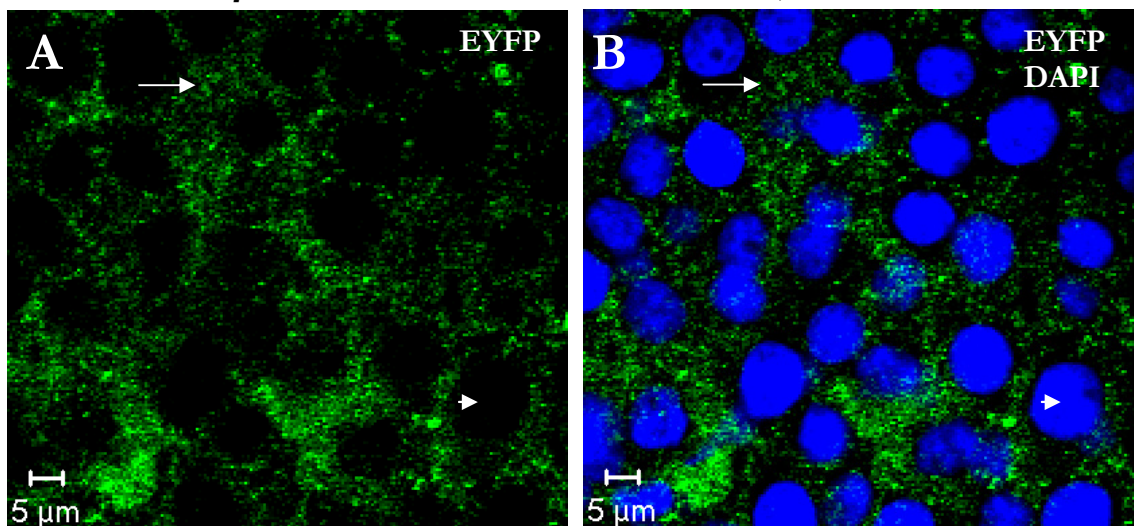


Abb. 32: Bei hER β -EYFP exprimierenden PC-12 Zellen (hier 24 Stunden nach Transfektion) ist das Fusionsprotein vor allem zytoplasmatisch lokalisiert (Pfeile). Das Verteilungsmuster ist punktförmig und intensiv. Der Zellkern ist größtenteils ausgespart (Pfeilspitzen; A: Fluoreszenz des Fusionsproteins, B: Überlagerung mit der DAPI-Färbung).

Eindeutig membranständige Fusionsproteine waren weder bei ECFP-hER β exprimierenden noch bei mit hER β -EYFP transfizierten PC-12 Zellen auszumachen (s. Abb. 30, Abb. 31 und Abb. 32).

5.2.4 Schnelle Änderung der Rezeptorlokalisierung

Um eine eventuelle schnelle Verlagerung der Fusionsproteine an die Zellmembran nachzuvollziehen, wurden lebende Zellen mit 10 nM 17 β -Östradiol stimuliert und nach 1, 6, 9, 15, 30, 45 und 60 min betrachtet. Mit ECFP-hER β transfizierte PC-12 Zellen zeigten eine gleichmäßige Fluoreszenzverteilung im Zellkern oder, da speziell nach Zellen mit extranukleärer Fluoreszenz gesucht worden war, über die gesamte Zelle. Die Stimulation mit Östradiol bewirkte keine Veränderung des Fluoreszenzmusters (s. Abb. 33). Bei den hER β -EYFP exprimierenden Zellen war eine gleichmäßige Fluoreszenzverteilung über die gesamte Zelle zu beobachten. Auch hier änderte die Zugabe von 17 β -Östradiol nichts an der Färbung der Zelle (s. Abb. 34). Weder bei ECFP-hER β noch bei hER β -EYFP exprimierenden PC-12 Zellen konnten membrannahe Ansammlungen beobachtet werden (s. Abb. 33 und Abb. 34). Bei den unstimulierten Kontrollen waren keine Veränderungen des Fluoreszenzmusters 1h nach Beginn des Versuches zu sehen.

Schnelle Änderung der Rezeptorlokalisierung: ECFP-hER β

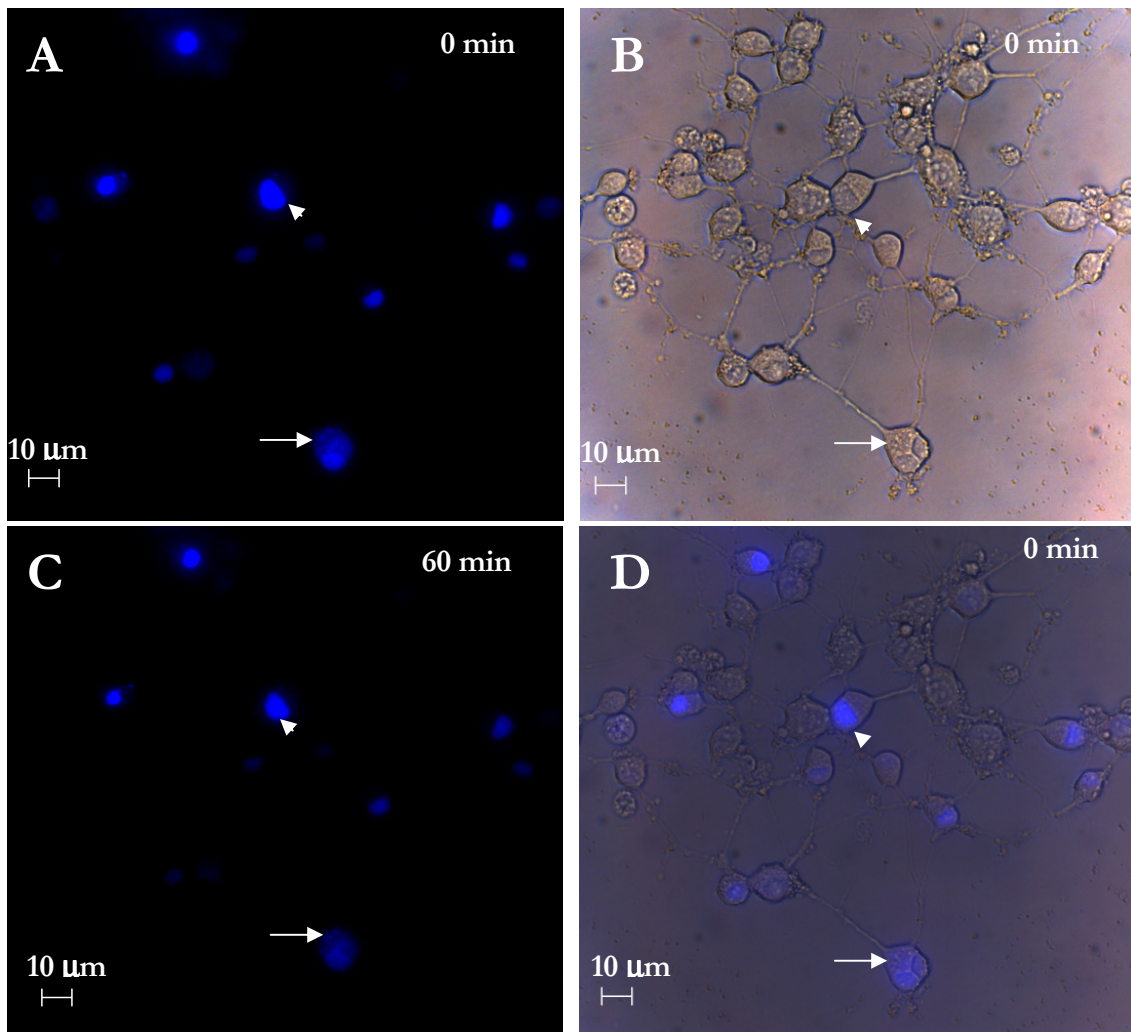


Abb. 33: Nach einer Stunde Stimulation mit E2 (C) hat sich das Fluoreszenzmuster von zytoplasmatischem ECFP-hER β (Pfeil) und strikt nukleärem ECFP-hER β (Pfeilspitze) nicht verändert (A: ECFP-hER β vor Stimulation, B: zugehöriges Hellfeldbild; D: ECFP-hER β (A) und Hellfeldbild (B) übereinander).

Schnelle Änderung der Rezeptorlokalisierung: hER β -EYFP

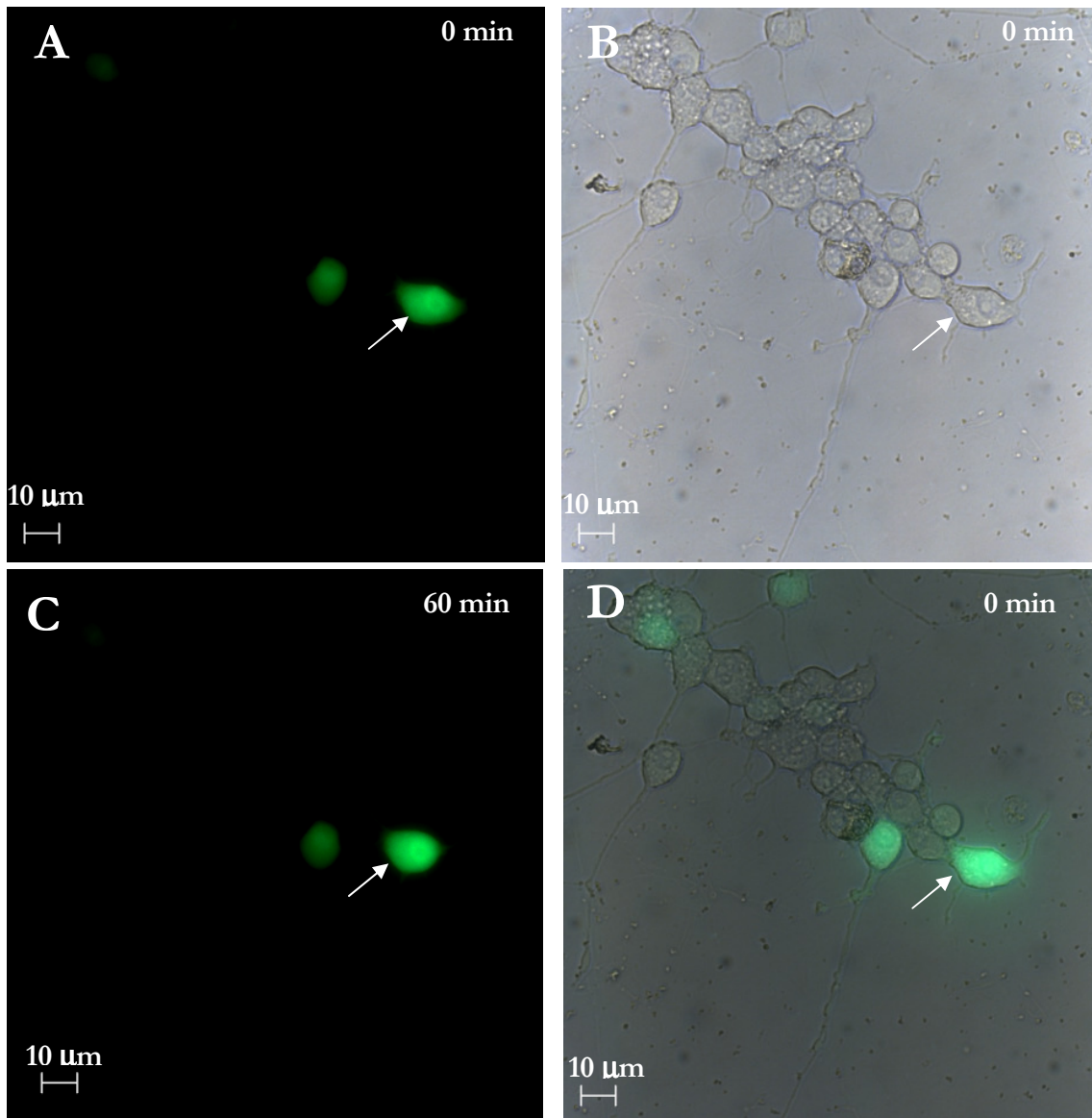


Abb. 34: Nach 60 min Stimulation mit E2 (C) ist keine Umverteilung von hER β -EYFP im Vergleich zum Ausgangszustand (A: hER β -EYFP, B: Hellfeld, D: Fluoreszenz- und Hellfeldbild übereinander) zu erkennen. Das Zytoplasma bleibt gleichmäßig angefärbt (Pfeile).

6 DISKUSSION

6.1 Klonierung des hER β -Gens

Für die Fragestellung, ob der nukleäre Östrogenrezeptor beta in einer membrangebundenen Form vorkommt, ist das Verständnis der methodischen Herangehensweise sehr wichtig. Da es in der Literatur Hinweise gibt, dass allein die Position des fluoreszierenden Proteins im Gesamtprotein eine Auswirkung auf die zelluläre Lokalisation haben kann (Simpson et al. 2000), wurde in dieser Arbeit eine N- und C-terminale Fusionsvariante von hER β kloniert. Das Östrogenrezeptor β -Gen wurde durch PCR amplifiziert und mit Attachment Sites versehen, die es ermöglichen, das Gateway-Vektor-System von Invitrogen zu verwenden. Es entstanden die zwei Nukleinsäurefragmente attB-hER β -C und attB-hER β -N zur späteren C-terminalen bzw. N-terminalen Fusion des Rezeptors mit einem fluoreszierenden Protein. Die Größe der Nukleinsäurebanden in der Agarosegelelektrophorese entspricht den erwarteten Molekülgrößen von attB-hER β -C und attB-hER β -N.

Die Entryvektoren wurden in *E. coli* angezchtet und anschließend durch Miniprep isoliert. Zur Gewinnung einer größeren Anzahl an Kopien der Entryvektoren wurde eine Maxiprep vorgenommen. Zur genaueren Überprüfung der Entryvektoren wurden diese durchsequenziert. Sowohl in phER β -N, als auch in phER β -C wies die DNA-Sequenz eine Punktmutation an Position 1082 auf. Diese bewirkt eine Änderung des Basentriplets GTG zu GTA. Beide Triplets kodieren jedoch für die Aminosäure Valin, es handelt sich also um eine stumme Mutation. Des weiteren ergab die Analyse von phER β -C eine Mutation an Position 150. Diese Punktmutation führt zu einem Austausch von Cystein gegen Arginin an Aminosäureposition 18 (C18R; Löffler 2001). C18R befindet sich in der A/B-Domäne von hER β (Ogawa et al. 1998). Nukleäre Lokalisationssignale (NLS), deren Störung eine Rezeptorfehllokalisierung aus dem Zellkern in das Zytoplasma zur Folge haben könnten, sind jedoch konstitutiv nur für die C- und D-Domäne sowie als ligandeninduzierbares NLS, für die E-Domäne bekannt (Ylikomi et al. 1992). Das Fehlen der A/B-Domäne führte in anderen Untersuchungen für ER α nicht zu einer Änderung einer nukleären Translokation nach Östrogenstimulation (Lu et al. 2002). Die hER α -Isoform hER α 46, der die A/B-Domäne fehlt, ist in MCF-7 Zellen fast ausschließlich nukleär zu finden (Penot et al. 2005). Ebenso bewirkte eine Deletion der Aminosäuren 1-64 des murinen ER β keine Veränderung

der Transaktivierung von ER β durch SRC-1 (Tremblay et al. 1999). Auch wurde die Bindung von Östradiol an der Plasmamembran sowie die Aktivierung von ERK in mit ER α -transfizierten Hamsteroovazellen nicht durch eine fehlende A/B-Domäne verringert (Razandi et al. 2003a). Des Weiteren ist die vorliegende Mutation in einer ER β -Isoform (ER β cx, GI3345671/AB006589) beschrieben worden und auch diese Isoform ist nukleär lokalisiert (Critchley et al. 2002, Saji et al. 2002, Saunders et al. 2002). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass der Aminosäureaustausch an Position 18 einen Einfluss auf die Lokalisation von hER β hat.

Die unter Verwendung der Gateway-Technologie erstellten Expressionsvektoren pECFP-hER β (Fusion von ECFP an den N-Terminus von hER β) und phER β -EYFP (Kopplung des C-Terminus von hER β an EYFP) wurden in einer Maxiprep aufgereinigt. In der im Anschluss zur detaillierten Analyse vorgenommenen DNA-Sequenzierung ergab sich die korrekte Sequenz der Übergangsregion zwischen dem jeweiligen Gen für ein fluoreszierendes Protein und hER β , ohne Rasterschub oder Basenaustausch. Auch die ersten (pECFP-hER β) bzw. letzten (phER β -EYFP) 220 Basenpaare des Gens für hER β entsprachen der Originalsequenz. Das Umklonieren von hER β aus den Entryvektoren in die Zielvektoren hat demzufolge ohne Veränderungen der DNA-Sequenz stattgefunden.

6.2 Expression von fluoreszierenden hER β -Fusionsproteinen in PC-12 Zellen

6.2.1 Überprüfung der Expression

Die Östrogenrezeptor-Fluoreszenzkonstrukte wurden durch liposomenvermittelten Transport in die Zellen eingeschleust. Um den Erfolg dieses Transports möglichst schnell und einfach überprüfen zu können und auch die Transkription der Konstrukte nachzuweisen, wurde aus transfizierten Zellen mRNA isoliert. Die Identität der transfizierten, fluoreszierenden Moleküle wurde dann durch RT-PCR überprüft. Die Amplifikation eines

DNA-Abschnittes der berechneten Größe unter Verwendung spezifischer Primer für pECFP-hER β bzw. pHER β -EYFP bei negativer Kontrolle mit dem jeweiligen anderen Primerpaar zeigt, dass es sich bei der extrahierten mRNA um die mRNA der fluoreszierenden Östrogenrezeptoren handelt. Dies wurde durch die anschließend vorgenommene DNA-Sequenzierung bestätigt. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die fluoreszierenden PC-12 Zellen erfolgreich mit ECFP-hER β bzw. hER β -EYFP transfiziert wurden. Die Detektion der Fluoreszenz im blau-grünen bzw. gelben Bereich ist also zur intrazellulären Lokalisation von ECFP-hER β und hER β -EYFP geeignet.

6.2.2 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit

Zunächst wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit untersucht. Die Analyse der Fluoreszenzdetektion von ECFP-hER β und hER β -EYFP mit OpenLab zeigte keine signifikanten Veränderungen über einen Zeitraum von 72 Stunden. Die Expression der transfizierten Fusionsproteine war also über den beobachteten Zeitraum stabil. Eine Grundvoraussetzung für die Verwendung der Fusionsproteine zur Lokalisation von ER β ist hiermit erfüllt gewesen.

6.2.3 Östrogenwirkung auf die Fluoreszenzintensität

Als nächstes wurden die Auswirkungen einer Östrogenstimulation auf die Fluoreszenzintensität pro Zelle analysiert. Bei mit ECFP-hER β und hER β -EYFP transfizierten Zellen war keine Veränderung durch die Östradiolstimulation zu beobachten. Dies war auch nicht zu erwarten gewesen, da in den transfizierten Vektoren pECFP-hER β und pHER β -EYFP kein ERE vorhanden war und daher ein hormoneller Mechanismus zur Regulation der Fusionsprotein-Expression fehlte. Somit zeigte sich keine Beeinflussung der Gesamtfluoreszenzintensität mit der Zeit oder durch Östradiolstimulation.

6.2.4 Nukleozytoplasmatische Verteilung der Fusionsproteine

Seit der Entdeckung von Steroidrezeptoren, zu denen der Östrogenrezeptor gehört, herrscht die Lehrmeinung vor, dass Steroidrezeptoren nukleäre Rezeptoren darstellen. Zunächst

wurde ein Zwei-Schritt-Modell der Aktivierung entworfen, dem zu Folge Östrogen an inaktive, ligandenungebundene Rezeptoren im Zytoplasma bindet, woraufhin der jetzt aktivierte, ligandengebundene Östrogenrezeptor in den Zellkern verlagert wird (Jensen et al. 1968). Später wurde jedoch eine ligandenunabhängige nukleäre Lokalisation (King und Greene 1984, Welshons et al. 1984, Htun et al. 1999, Matsuda et al. 2002) beschrieben. Schließlich wurden Rezeptoren sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert (Blaustein et al. 1992, Toran-Allerand et al. 2002, Mitra et al. 2003, Prange-Kiel et al. 2003). Auch ein kontinuierliches nukleozytoplasmatisches Shuttling wurde, zumindest für ER α , vorgeschlagen (Dauvois et al. 1993, Maruvada et al. 2003). Die Auffassung des Östrogenrezeptors als nukleären Rezeptor wird durch das Vorhandensein einer DNA-bindenden Domäne (DBD) und dem Nachweis, dass der Rezeptor auch tatsächlich DNA bindet, eindeutig bestätigt (Tremblay et al. 1997). Dies könnte auch erklären, warum neben dem Nachweis von Östrogenrezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum (Blaustein et al. 1992, Qualmann et al. 2000, Monje und Boland 2001, Milner et al. 2005) auch Rezeptoren in Mitochondrien beschrieben wurden (Monje und Boland 2001, Chen et al. 2004a, Yang et al. 2004). In diesen Zellorganellen binden die Rezeptoren mitochondriale DNA (Chen et al. 2004b). Völlig überraschend aber war, dass der Östrogenrezeptor als membrangebundener Rezeptor beschrieben wurde (Pappas et al. 1995, Razandi et al. 1999, Clarke et al. 2000). Das eigentlich überraschende hierbei war nicht das Vorkommen eines membranständigen Östrogenrezeptors, sondern die Vermutung, dass der nukleäre Östrogenrezeptor an der Plasmamembran vorkommen sollte. Es sei nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen, dass weder ER α noch ER β bekannte Aminosäuresequenzen von membranständigen Proteinen aufweisen. In mehreren Arbeiten wurde die intrazelluläre Verteilung von Hybriden aus fluoreszierenden Proteinen und den klassischen ER untersucht. Hierbei wurde für ER α und ER β eine nukleäre Lokalisation östrogenstimulierter und nichtstimulierter Rezeptoren beobachtet. Die Stimulation mit Östrogen führte zu einer intranukleären Umverteilung von einem homogenen zu einem cluster-artigen, punktierten Muster (Htun et al. 1999, Pasqualini et al. 2001, Matsuda et al. 2002). Andere Veröffentlichungen beschreiben Fusionsproteine aus fluoreszierenden Proteinen und klassischen ER in Neuriten (Xu et al. 2003) oder an der Zellmembran (Lu et al. 2002, Razandi et al. 2003a).

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Fusionsproteine aus ECFP bzw. EYFP und dem bekannten nukleären hER β in PC-12 Zellen untersucht, ob eine zeit- und hormonabhängige

Veränderung der intrazellulären Verteilung von hER β vorliegt. Weiterhin wurde analysiert, ob Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation zwischen einer N- und C-terminal fluoreszenzmarkierten Variante von hER β bestehen. Die erhaltene Funktionsfähigkeit fluoreszenzmarkierter Östrogenrezeptoren gemessen an der Fähigkeit zur Aktivierung von Estrogen Response Elements (ERE) ist aus anderen Arbeiten für N-terminal mit EGFP oder ECFP fusionierten ER β (Matsuda et al. 2002) sowie N-terminal mit EYFP (Matsuda et al. 2002) oder C-terminal mit EGFP (Xu et al. 2003) markierten ER α bekannt. Auch die Aktivierung von MAPK scheint durch N- oder C-terminal fluoreszenzmarkierten ER α möglich zu sein (Xu et al. 2003).

6.2.5 Lokalisation der unstimulierten hER β -Fusionsproteine

Beim Blick auf die intrazelluläre Verteilung der Fusionsproteine wird deutlich, dass ECFP-hER β größtenteils im Zellkern lokalisiert ist. Diese Lokalisation unstimulierter Östrogenrezeptoren entspricht der aus anderen Studien mit fluoreszierenden Fusionsproteinen (Stenoien et al. 2000, Matsuda et al. 2002, Maruvada et al. 2003, Xu et al. 2003, Ochiai et al. 2004) oder Immunhistochemie (King und Greene 1984, Welshons et al. 1984) bekannten. hER β -EYFP hingegen weist bei der konventionell-mikroskopischen Betrachtung neben nukleären Rezeptorhybriden auch einen großen Anteil zytoplasmatischer Moleküle auf. Konfokalmikroskopisch erweisen sich die meisten Zellkerne gar als von der EYFP-Fluoreszenzfärbung ausgespart. Das Zytoplasma präsentiert sich unter dem Konfokalmikroskop nicht als homogene Fläche, sondern fein granuliert. Eine Lokalisation in Zellorganellen wie Mitochondrien (Monje und Boland 2001, Cammarata et al. 2004, Chen et al. 2004a, Yang et al. 2004, Milner et al. 2005) oder Endoplasmatischem Retikulum (Blaustein et al. 1992, Qualmann et al. 2000, Monje und Boland 2001, Milner et al. 2005), wie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, wäre möglich. Zur Klärung einer zellorganellassozierten Lokalisation wäre die Colokalisation mit spezifischen Markern der Zellorganellen notwendig, die aber in dieser Arbeit nicht untersucht werden sollte.

In der visuellen Zählung des Anteils an fluoreszierenden Zellen, die ein gemischt nukleozytoplasmatisches Muster aufweisen, bestätigt sich der Eindruck, dass der Anteil zytoplasmatisch lokalisierter Rezeptoren mit C-terminaler Markierung (hER β -EYFP) wesentlich über dem bei N-terminaler Markierung (ECFP-hER β) liegt. In einigen Studien waren N-terminal fusionierte ER α (Htun et al. 1999, Matsuda et al. 2002, Xu et al. 2003) und

ER β (Matsuda et al. 2002) genau wie in dieser Arbeit in ligandenungebundenem und ligandengebundenem Zustand im Zellkern zu sehen. Erkenntnisse über eine C-terminale Kopplung liegen für ER α vor. Auch hier befand sich der Rezeptor im Zellkern (Pasqualini et al. 2001, Xu et al. 2003). ER α -Isoformen, denen ein Zinkfinger oder die D-Domäne mit NLS und Teilen der LBD fehlte, befanden sich auch im Zytoplasma (Pasqualini et al. 2001). Die geschilderten Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass sich die Lokalisation von C-terminal markiertem ER β von N-terminal markiertem unterscheidet. In Anbetracht dieser Tatsache ist eine Bedeutung der Fusionsreihenfolge für die intrazelluläre Rezeptorlokalisierung anzunehmen. Des Weiteren existieren für neuronale Zellen auch Berichte über C- und N-terminal fusionierte ER α , die vom Ort der Proteinbiosynthese direkt in Neuriten transportiert wurden (Xu et al. 2003). Daher wäre auch denkbar, dass die Lokalisation zellspezifisch ist. In immunhistologischen Untersuchungen wurden regionale Unterschiede der intrazellulären Lokalisation von ER β im ZNS gefunden (Mitra et al. 2003, Kalita et al. 2005).

6.2.6 Veränderung der intrazellulären Verteilung mit der Zeit

Auch die nukleozytoplasmatische Verteilung von ECFP-hER β erweist sich als zeitunabhängig. Sowohl in der Analyse durch OpenLab, als auch in der visuellen Auswertung, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert wurden. Ähnlich verhält es sich mit hER β -EYFP: Durch die Beobachtung mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie sind keine zeitbedingten Unterschiede zu sehen.

6.2.7 Veränderung der intrazellulären Verteilung durch Östradiol

In verschiedenen Veröffentlichungen ist beschrieben, dass die Stimulation mit Östradiol zu einer Akkumulation von Östrogenrezeptor-Fluoreszenzprotein-Fusionsproteinen in Clustern mit bisher unbekannter Bedeutung führt (Htun et al. 1999, Stenoien et al. 2000, Pasqualini et al. 2001, Matsuda et al. 2002, Maruvada et al. 2003, Ochiai et al. 2004, Jankevics et al. 2005). Auch in dieser Arbeit konnten solche scholligen nukleären Cluster in einem Teil der östrogenstimulierten Zellen konfokalmikroskopisch beobachtet werden. Im Gegensatz zu

anderen Ergebnissen (Stenoien et al. 2000, Matsuda et al. 2002, Maruvada et al. 2003, Ochiai et al. 2004) war diese Redistribution nicht bei nur kurzzeitig (30 min) stimulierten Zellen, sondern nur bei längerer (24 h) Stimulation zu erkennen gewesen. Allerdings sind verschiedene zeitliche Maxima der Redistribution beschrieben. So wird für HeLa Zellen ein maximaler Effekt nach 30 min angegeben (Stenoien et al. 2000), während andere Versuche in COS-1 Zellen einen Gipfel nach ebenfalls 30 min (Matsuda et al. 2002) bzw. erst nach 60 min (Ochiai et al. 2004) ergaben. Es scheint also eine gewisse Variationsbreite im zeitlichen Verlauf zwischen verschiedenen Zelllinien bzw. in verschiedenen Versuchen zu geben.

Die PC-12 Zellen wiesen in den durchgeführten Untersuchungen nach Östradiolzugabe keine Veränderung des zytoplasmatischen Anteils der ECFP-hER β -Fluoreszenzintensität an der Gesamtfluoreszenzintensität auf. Auch die visuelle Auswertung zeigte keine östrogeninduzierte Veränderung. Gleiches gilt für die computergestützte und visuelle Analyse von hER β -EYFP exprimierenden Zellen. Auch hier waren keine signifikanten Differenzen nach Östrogenstimulation zu beobachten. Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine Abnahme zytoplasmatischer Fusionsproteine im Sinne einer Translokation in den Zellkern im Rahmen eines Zwei-Stufen Prozesses (Jensen et al. 1968) nicht zu erkennen war.

Auch die Untersuchung einer möglichen schnellen Änderung der Rezeptorlokalisierung innerhalb von 60 Minuten ließ keine Veränderungen in der Verteilung der Fusionproteine nach Östradiolzugabe erkennen. Zytoplasmatisch fluoreszierende Zellen zeigten auch eine Stunde nach Stimulation mit 10^{-8} M 17β -Östradiol das gleiche nukleozytoplasmatische Muster. Eine Verlagerung der fluoreszierenden Moleküle an die Zellmembran oder in den Zellkern war nicht zu erkennen.

Die Ergebnisse für ECFP-hER β stehen somit im Einklang mit vorhergehenden Studien, in denen für ER α (Htun et al. 1999, Stenoien et al. 2000, Matsuda et al. 2002, Ochiai et al. 2004) und ER β (Matsuda et al. 2002) keine Veränderungen der nukleozytoplasmatischen Verteilung, sondern lediglich der intranukleären Distribution festzustellen waren. hER β -EYFP, in dem das Fluoreszenzprotein C-terminal an den Östrogenrezeptor β gekoppelt ist, zeigte eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des hER β , die sich ebenfalls nicht durch E2-Zugabe änderte. Eine solche hormonunabhängige Lokalisation von C-terminal

markierten Rezeptoren ist für ER α -Isoformen beschrieben, denen die D-Domäne mit wichtigen nukleären Lokalisationssignalen fehlt (Pasqualini et al. 2001). Die aus Untersuchungen mit ER α bekannten NLS (Ylikomi et al. 1992) befinden sich jedoch in Domänen, die auch im hier verwendeten hER β vorhanden sind. Demnach hat allein die Klonierungsposition (N- oder C-terminal an hER) einen Einfluss auf die Lokalisation des gesamten Fusionsproteins in der Zelle. Andererseits befanden sich in anderen Veröffentlichungen auch N- oder C-terminal fluoreszenzmarkierte Wildtyp-ER α sowohl nukleär als auch in Neuriten. Die Stimulation mit Östradiol vor der Rezeptorsynthese bewirkte hier eine Ansammlung von Fusionsproteinen im Zellkern. Östradiol bewirkte jedoch keine Translokation von Rezeptoren aus den Fortsätzen in den Zellkern (Xu et al. 2003). Ein Zwei-Schritt-Modell war also auch hier nicht zu erkennen. Es wäre folglich möglich, dass direkt nach der Biosynthese von Östrogenrezeptoren diese entweder bei Abwesenheit von Östrogen in periphere extranukleäre Bereiche transportiert werden oder, unter Östrogeneinwirkung, in den Zellkern verlagert werden. Unter Berücksichtigung eines nukleozytoplasmatischen Pendelns ligandenungebundener Rezeptoren (Dauvois et al. 1993, Maruvada et al. 2003) wäre ein Modell denkbar, in dem ligandenungebundene Rezeptoren nach ihrer Synthese sowohl in den Zellkern, als auch in Bereiche des Zytoplasma wandern. Die zytoplasmatischen Rezeptoren würden dann nach Östrogenstimulation in diesen Bereichen verbleiben. Rezeptoren im Zellkern könnten eine intranukleäre Redistribution durchlaufen und sich in den beschriebenen Clustern ansammeln, während der nukleäre Export von Östrogenrezeptoren reduziert wird. In diesem Modell könnten zellspezifische Faktoren das Gleichgewicht zwischen nukleärer und extranukleärer Lokalisation beeinflussen.

6.2.8 Gibt es Östrogenrezeptoren an der Plasmamembran?

Weder durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, noch in der konfokalmikroskopischen Analyse waren eindeutige Verteilungsmuster im Sinne einer membranassoziierten Lokalisation von ECFP-hER β oder hER β -EYFP zu erkennen. Dies gilt sowohl für unstimulierte als auch für östradiolbehandelte PC-12 Zellen. Da, wie bereits erwähnt, sowohl ER α als auch ER β nicht über bekannte membranspannende Domänen verfügen, ist dieser Befund nicht völlig überraschend. Eine mögliche Assoziation von nukleären ERs und membrangebundenen Proteinen muss allerdings in Erwägung gezogen werden, da einige

Arbeitsgruppen membranständige Rezeptoren beschrieben haben. Bindungsstellen für Östrogen an der Plasmamembran sind in mehreren Studien dargestellt worden (Pietras und Szego 1977, Razandi et al. 1999, Alexaki et al. 2004). So konnten ER α (Pappas et al. 1995, Clarke et al. 2000, Adams et al. 2002, Lu et al. 2002, Razandi et al. 2002, Song et al. 2002) und ER β (Nishio et al. 2004, Milner et al. 2005) immunhistochemisch nachgewiesen werden. Auch in Membranfraktionen fanden sich ER α (Chambliss et al. 2002, Lu et al. 2002, Singh et al. 2002, Ropero et al. 2006) und ER β (Chambliss et al. 2002, Nishio et al. 2004, Reineri et al. 2007). Da in anderen Veröffentlichungen bekannte Membranproteine mittels Fluoreszenzmarkierung an der Plasmamembran lokalisiert werden konnten (Simpson et al. 2000), ist eine generelle Fehllokalisierung fluoreszenzmarkierter Membranproteine jedoch ausgeschlossen. Außerdem war der klassische nukleäre ER α nach Fluoreszenzmarkierung (EGFP-ER α) ebenfalls an der Plasmamembran beobachtet worden (Lu et al. 2002, Razandi et al. 2003a). Hierbei waren Östrogenrezeptoren detektiert worden, die an ihrem N-Terminus mit einem fluoreszierenden Protein markiert worden waren. In Membranlokalisierungsexperimenten wurde aber der C-terminalen E-Domäne eine wichtige Funktion für die Lokalisation von ER α an der Plasmamembran zugeschrieben (Razandi et al. 2002, Razandi et al. 2003a, Acconcia et al. 2005). Es wäre daher möglich, dass die C-terminale Fusion in hER β -EYFP einen Einfluss auf die ordnungsgemäße Lokalisation des Fusionsproteins hat. Die Kopplung von EYFP an den C-Terminus von ER α könnte eine Veränderung der Struktur oder Ausrichtung von Membranlokalisierungssignalen der E-Domäne haben. Dies könnte eine korrekte Lokalisation an der Plasmamembran, vermittelt durch die C-terminale E-Domäne, verhindern. Alternativ wird in der vorliegenden Arbeit ein membranassoziierter Aufenthaltsort im Falle von hER β -EYFP durch den viel größeren zytoplasmatischen Fusionsproteinpool überlagert. So ist aus Studien mit Ovarzellen vom Hamster das Dichteverhältnis von nukleärem und plasmamembranständigem ER β mit 62:1 angegeben worden (Razandi et al. 1999). Dies könnte zur Folge haben: Das gesamte Zytoplasma fluoresziert so stark, dass eine fokale Ansammlung von Membranrezeptoren überstrahlt wird. Die in anderen Arbeiten demonstrierte Assoziation von Östrogenrezeptoren mit Plasmamembranmolekülen wie Caveolin-1 (Razandi et al. 2002) oder dem IGF-1-Rezeptor (Song et al. 2004) könnte dazu verwendet werden, über eine Colokalisation von hER β und Plasmamembranproteinen eine Membranlokalisation des Östrogenrezeptors zu verdeutlichen.

Auf der anderen Seite hat der Großteil an Arbeitsgruppen in Untersuchungen hinsichtlich N-terminaler Fusion von ER α (Htun et al. 1999, Matsuda et al. 2002) und ER β (Matsuda et al. 2002) mit fluoreszierenden Proteinen auch keine Membranrezeptoren beschrieben. Eine Membranlokalisation von fluoreszenzmarkiertem ER β wurde bisher nicht berichtet. Eine ubiquitäre Lokalisation der klassischen Östrogenrezeptoren alpha und beta an der Zellmembran erscheint hiermit ausgeschlossen. Allerdings wären zellspezifische Unterschiede in der Lokalisation oder zumindest in der quantitativen Verteilung denkbar. In den hier verwendeten PC-12 Zellen wurden Östrogenbindungsstellen an der Plasmamembran gefunden, deren molekulare Identität jedoch noch unbekannt ist (Alexaki et al. 2004).

Einige Untersuchungen weisen auf Östrogenrezeptoren hin, die zwar Ähnlichkeiten mit den klassischen nukleären Rezeptoren zeigen, sich aber von diesen unterscheiden. So konnten Proteine mit Antikörpern gegen ER α (Toran-Allerand et al. 2002, Heberden et al. 2006, Marin et al. 2006) bzw. ER β (Arvanitis et al. 2004) detektiert werden, die ein von den klassischen Östrogenrezeptoren abweichendes Molekulargewicht aufwiesen. In diesem Zusammenhang wurde bereits ein neuartiger Östrogenrezeptor X vorgeschlagen (Toran-Allerand et al. 2002). Darüber hinaus existieren Beschreibungen einer Detektion des G-Proteingekoppelten Rezeptors 30 (GPR30) als membranständigem Östrogenrezeptor (Funakoshi et al. 2006). Es wäre somit möglich, dass Östrogenbindungsstellen auf der Zelloberfläche existieren, bei denen es sich weder um ER α noch um ER β handelt.

Die Annahme membrangebundener Östrogenrezeptoren beruht unter anderem auf der Analyse östrogeninduzierter Effekte, die nicht durch eine genomische Funktion der klassischen ER erklärbar sind (Toran-Allerand 2004). Solche nicht-genomischen Effekte setzen jedoch nicht zwangsläufig die Existenz membranständiger Rezeptoren voraus. Es wäre auch denkbar, dass die Einflussnahme von Östrogenen auf Signaltransduktionskaskaden nach Bindung an intrazelluläre Östrogenrezeptoren stattfindet. Die Rezeptoren könnten im Zellkern oder Zytoplasma mit anderen Signalmolekülen interagieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine ubiquitäre, zelltypunabhängige membranständige Lokalisation der klassischen Östrogenrezeptoren nicht vorzukommen scheint. Das zellspezifische Vorkommen der klassischen nukleären Östrogenrezeptoren alpha und beta an der Zellmembran ist nicht auszuschließen, wobei es Hinweise gibt, dass

östrogeninduzierte Effekte durch membranassoziierte Östrogenrezeptoren vermittelt werden, die sich von den klassischen Östrogenrezeptoren unterscheiden (Toran-Allerand et al. 2002, Arvanitis et al. 2004, Funakoshi et al. 2006, Heberden et al. 2006, Marin et al. 2006).

7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die intrazelluläre Verteilung des nukleären Östrogenrezeptors beta untersucht werden. Von speziellem Interesse war eine mögliche Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran. Als Zellmodell dienten PC-12 Zellen, eine Sekundärzelllinie aus einem Tumor des Nebennierenmarkes der Ratte. Östrogenrezeptoren stellen nach dem bisherigen Verständnis nukleäre Transkriptionsfaktoren dar. In den letzten Jahren sind jedoch Östrogeneffekte beobachtet worden, die aufgrund ihres zeitlichen Verlaufs und der intrazellulären Lokalisation nicht durch eine Modulation der Genexpression zu erklären sind. Es wurden deshalb plasmamembranassoziierte Östrogenrezeptoren postuliert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Lokalisation der Steroidrezeptoren und Auswirkungen von Östrogen auf die intrazelluläre Verteilung analysiert. Hierzu wurde der humane Östrogenrezeptor beta (hER β) N- bzw. C-terminal mit fluoreszierenden Proteinen, dem Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) und dem Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP), markiert. Die Fusionsgene wurden in PC-12 Zellen transfiziert und die intrazelluläre Verteilung der fluoreszierenden Rezeptoren mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie betrachtet.

Die intrazelluläre Lokalisation von hER β war abhängig von der Position der Fluoreszenzmarkierung im Rezeptormolekül. Es zeigte sich eine nukleäre Akkumulation der N-terminal fusionierten Östrogenrezeptoren, wohingegen C-terminal markierte Moleküle überwiegend zytoplasmatisch zu finden waren. Der nukleäre Östrogenrezeptor beta war zu keinem Zeitpunkt an der Plasmamembran lokalisiert. Die Stimulation mit 17 β -Östradiol bewirkte eine Umverteilung von hER β im Zellkern, aber keine Umverteilung zwischen verschiedenen Zellkompartimenten. Insbesondere war keine Translokation der Proteine an die Plasmamembran auszumachen.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass entweder im gewählten Zellmodell keine Assoziation mit der Plasmamembran stattfindet, oder diese nicht darzustellen ist. Techniken, die spezifisch Zelloberflächenbestandteile nachweisen oder spezifisch Komponenten der Plasmamembran darstellen, sind zur weiteren Untersuchung des Sachverhaltes notwendig.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 16 (1): 231-7

Adams MM, Fink SE, Shah RA, Janssen WG, Hayashi S, Milner TA, McEwen BS, Morrison JH (2002) Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats. *J Neurosci* 22 (9): 3608-14

Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Vassalou H, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E (2004) Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation. *FASEB J* 18 (13): 1594-6

Arvanitis DN, Wang H, Bagshaw RD, Callahan JW, Boggs JM (2004) Membrane-associated estrogen receptor and caveolin-1 are present in central nervous system myelin and oligodendrocyte plasma membranes. *J Neurosci Res* 75 (5): 603-13

BD Biosciences Clontech (2002) Vector information, PT3192-5, PR29945. Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes

BD Biosciences Clontech (2002) Vector information, PT3259-5, PR29964. Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes

Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Human Reprod Update* 6 (3): 225-36

Blaustein JD, Lehman MN, Turcotte JC, Greene G (1992) Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pig hypothalamus. *Endocrinology* 131 (1): 281-90

Boulware MI, Weick JP, Becklund BR, Kuo SP, Groth RD, Mermelstein PG (2005) Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 25 (20): 5066-78

Cammarata PR, Chu S, Moor A, Wang Z, Yang SH, Simpkins JW (2004) Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 78 (4): 861-71

Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW (2002) ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol* 16 (5): 938-46

Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD (2004) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (6): E1011-22

Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, Yager JD (2004) Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J Cell Biochem* 93 (2): 358-73

Clarke CH, Norfleet AM, Clarke MS, Watson CS, Cunningham KA, Thomas ML (2000) Perimembrane localization of the estrogen receptor alpha protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 71 (1): 34-42

Critchley HO, Henderson TA, Kelly RW, Scobie GS, Evans LR, Groome NP, Saunders PT (2002) Wild-type estrogen receptor (ERbeta1) and the splice variant (ERbetacx/beta2) are both expressed within the human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (11): 5265-73

Dauvois S, White R, Parker MG (1993) The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106 (4): 1377-88

Deroo BJ und Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116 (3): 561-70

Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346 (3): 904-10

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63 (1): 29-60

Greene LA und Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 (7): 2424-8

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (20): 10751-6

Heberden C, Reine F, Grosse B, Henry C, Zagar Y, Chaumaz G, Lieberherr M (2006) Detection of a raft-located estrogen receptor-like protein distinct from ER alpha. *Int J Biochem Cell Biol* 38 (3): 376-91

Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL (1999) Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell* 10 (2): 471-86

Invitrogen (2002) Gateway Technology Instruction Manual, Version C. Invitrogen, Carlsbad

Jankevics H, Prummer M, Izewska P, Pick H, Leufgen K, Vogel H (2005) Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. *Biochemistry* 44 (35): 11676-83

Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER (1968) A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 59 (2): 632-8

Kalita K, Szymczak S, Kaczmarek L (2005) Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus* 15 (3): 404-12

King WJ und Greene GL (1984) Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307 (5953): 745-7

Koski CL, Hila S, Hoffman GE (2004) Regulation of cytokine-induced neuron death by ovarian hormones: involvement of antiapoptotic protein expression and c-JUN N-terminal kinase-mediated proapoptotic signaling. *Endocrinology* 145 (1): 95-103

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (12): 5925-30

Lee E, Mun GH, Oh CS, Chung YH, Cha CL, Lee YS, Shin DH (2004) A subcellular distribution of estrogen receptor- α is changed during artificially induced senescence of PC12 pheochromocytoma cells. *Neurosci Lett* 372 (1-2): 80-4

Linford N, Wade C, Dorsa D (2000) The rapid effects of estrogen are implicated in estrogen-mediated neuroprotection. *J Neurocytol* 29 (5-6): 367-74

Löffler G (2001) *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 4., korrigierte. Aufl.. Springer, Berlin Heidelberg New York Barcelona Hongkong London Mailand Paris Singapur Tokio

Lu Q, Ebling H, Mittler J, Baur WE, Karas RH (2002) MAP kinase mediates growth factor-induced nuclear translocation of estrogen receptor α . *FEBS Lett* 516 (1-3): 1-8

Lustig RH, Hua P, Yu W, Ahmad FJ, Baas PW (1994) An in vitro model for the effects of estrogen on neurons employing estrogen receptor-transfected PC12 cells. *J Neurosci* 14 (6): 3945-57

Maharjan S, Serova L, Sabban EL (2005) Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors α and β and interactions with cyclic AMP. *J Neurochem* 93 (6): 1502-14

Marin R, Ramirez CM, Gonzalez M, Alonso R, Diaz M (2006) Alternative estrogen receptors homologous to classical receptor α in murine neural tissues. *Neurosci Lett* 395 (1): 7-11

Marino M, Pallottini V, Trentalance A (1998) Estrogens cause rapid activation of IP3-PKC- α signal transduction pathway in HEPG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245 (1): 254-8

Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM (2003) Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 278 (14): 12425-32

- Matsuda K, Ochiai I, Nishi M, Kawata M (2002) Colocalization and ligand-dependent discrete distribution of the estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta. *Mol Endocrinol* 16 (10): 2215-30
- McDonnell DP, Norris JD (2002) Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296 (5573): 1642-4
- McEwen BS (2001) Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91 (6): 2785-801
- Merot Y, Ferriere F, Debroas E, Flouriot G, Duval D, Saligaut C (2005) Estrogen receptor alpha mediates neuronal differentiation and neuroprotection in PC12 cells: critical role of the A/B domain of the receptor. *J Mol Endocrinol* 35 (2): 257-67
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15 (6): 1292-300
- Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE (2005) Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 491 (2): 81-95
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144 (5): 2055-67
- Monje P, Boland R (2001) Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem* 82 (3): 467-79
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392 (1): 49-53
- Nilsen J, Mor G, Naftolin F (1998) Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause* 5 (4): 211-6

Nishio M, Kuroki Y, Watanabe Y (2004) Subcellular localization of estrogen receptor beta in mouse hippocampus. *Neurosci Lett* 355 (1-2): 109-12

Ochiai I, Matsuda K, Nishi M, Ozawa H, Kawata M (2004) Imaging analysis of subcellular correlation of androgen receptor and estrogen receptor alpha in single living cells using green fluorescent protein color variants. *Mol Endocrinol* 18 (1): 26-42

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998) 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* 243 (1): 122-6

Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9 (5): 404-10

Pasqualini C, Guivarc'h D, Barnier JV, Guibert B, Vincent JD, Vernier P (2001) Differential subcellular distribution and transcriptional activity of sigmaE3, sigmaE4, and sigmaE3-4 isoforms of the rat estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 15 (6): 894-908

Pawlak J, Karolczak M, Krust A, Chambon P, Beyer C (2005) Estrogen receptor-alpha is associated with the plasma membrane of astrocytes and coupled to the MAP/Src-kinase pathway. *Glia* 50 (3): 270-5

Penot G, Le Peron C, Merot Y, Grimaud-Fanouillere E, Ferriere F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Metivier R, Flouriot G (2005) The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146 (12): 5474-84

Pietras RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265 (5589): 69-72

Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE (2000) A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74 (5): 261-8

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13 (2): 226-34

Qualmann B, Kessels MM, Thole HH, Sierralta WD (2000) A hormone pulse induces transient changes in the subcellular distribution and leads to a lysosomal accumulation of the estradiol receptor alpha in target tissues. *Eur J Cell Biol* 79 (6): 383-93

Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13 (2): 307-19

Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16 (1): 100-15

Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER (2003) Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 23 (5): 1633-46

Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER (2003) Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278 (4): 2701-12

Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11 (3): 695-707

Reineri S, Bertoni A, Sanna E, Baldassarri S, Sarasso C, Zanfa M, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F (2007) Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1773 (2): 273-8

Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, Tang G, Toro L, Stefani E (2006) Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. *J Mol Cell Cardiol* 41 (3): 496-510

Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002) Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113 (1): 167-75

Saji S, Omoto Y, Shimizu C, Warner M, Hayashi Y, Horiguchi S, Watanabe T, Hayashi S, Gustafsson JA, Toi M (2002) Expression of estrogen receptor (ER) (beta) cx protein in ER (alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res* 62 (17): 4849-53

Saunders PT, Millar MR, Macpherson S, Irvine DS, Groome NP, Evans LR, Sharpe RM, Scobie GA (2002) ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (6): 2706-15

Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP (1999) Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. Caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem* 274 (47): 33551-6

Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, Baldacci C, Garibaldi S, Caruso A, Fornari L, Naftolin F, Genazzani AR (2006) Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol* 20 (8): 1756-71

Simoncini T, Genazzani AR (2000) Direct vascular effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Obstet Gynecol* 12 (3): 181-7

Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A; Pepperkok R, Wiemann S (2000) Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep* 1 (3): 287-92

Singh S, Shaul PW, Gupta PD (2002) Conventional estrogen receptors are found in the plasma membrane of vaginal epithelial cells of the rat. *Steroids* 67 (9): 757-64

Singh M, Dykens JA, Simpkins JW (2006) Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med (Maywood)* 231 (5): 514-21

Smith CL (1998) Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 58 (3): 627-32

Sohrabji F, Greene LA, Miranda RC, Toran-Allerand CD (1994) Reciprocal regulation of estrogen and NGF receptors by their ligands in PC12 cells. *J Neurobiol* 25 (8): 974-88

Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16 (1): 116-27

Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ (2004) The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (7): 2076-81

Stenoien DL, Mancini MG, Patel K, Allegretto EA, Smith CL, Mancini MA (2000) Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 14 (4): 518-34

Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES Jr, Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22 (19): 8391-401

Toran-Allerand CD (2004) Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* 145 (3): 1069-74

Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11 (3): 353-65

Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3 (4): 513-9

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

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrase G, Waterfield M, Chambon P (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (23): 7889-93

Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J (1984) Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307 (5953): 747-9

Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW (2001) Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J Biol Chem* 276 (29): 27071-6

Xu Y, Traystman RJ, Hurn PD, Wang MM (2003) Neurite-localized estrogen receptor-alpha mediates rapid signaling by estrogen. *J Neurosci Res* 74 (1): 1-11

Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (12): 4130-5

Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11 (10): 3681-94

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Uwe Wehrenberg für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Er hat mir über die Jahre geholfen, mein Ziel der Promotion zu realisieren. Auch bei Frau Prof. Dr. Gabriele Rune möchte ich mich dafür bedanken, dass ich in ihrem Institut arbeiten durfte und sie mir mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand. Darüber hinaus möchte ich Frau PD Dr. Janine Prange-Kiel meinen Dank für die Hilfe bei der Planung der konfokalmikroskopischen Experimente aussprechen. Des weiteren danke ich Herrn Dr. Michael Bubenheim für statistische Beratung. Herrn Dipl.-Humanbiol. Lars Fester danke ich für seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei Problemen mit technischen Geräten. Zu großem Dank bin ich Frau Herdis Hamann und Frau Helga Herbort verpflichtet, die mich geduldig in die Methodik eingearbeitet haben und stets mit helfender Hand zur Stelle waren. Zu guter Letzt möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

10 LEBENS LAUF

1 Persönliche Daten

Name:	von Thomsen
Vorname:	Alexander Jens
Geburtsdatum:	26. 06. 1979
Geburtsort:	Hamburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch

2 Schulbildung und Wehrdienst

1986 – 1990	Grundschule Kamminer Straße, Hamburg
1990 - 1999	Gymnasium Meiendorf, Hamburg
1999 - 2000	Wehrdienst

3 Akademischer Werdegang

2000 – 2006	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
11. Dezember 2006	Approbation als Arzt
2003-2007	Promotion am Institut für Anatomie I: Zelluläre Neurobiologie, Universität Hamburg
seit 2007	Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Alexander von Thomsen